

# **UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

**FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y ESPECIALIDADES MÉDICAS  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN ESPECIALIDADES MÉDICAS**



## **TESIS DOCTORAL**

**MODULACIÓN DE LA CICATRIZACIÓN EN UN MODELO  
ANIMAL DE DIABETES MEDIANTE EL EMPLEO DE  
HIDROGELES DE QUITOSANO FUNCIONALIZADOS  
CON HEPARINA SIN FRACCIONAR Y HEPARINA DE  
BAJO PESO MOLECULAR**

**ALBERTO CIFUENTES NEGRETE**

**2015**





# **UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

**FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y ESPECIALIDADES MÉDICAS  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN ESPECIALIDADES MÉDICAS**



## **TESIS DOCTORAL**

### **MODULACIÓN DE LA CICATRIZACIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE DIABETES MEDIANTE EL EMPLEO DE HIDROGELES DE QUITOSANO FUNCIONALIZADOS CON HEPARINA SIN FRACCIONAR Y HEPARINA DE BAJO PESO MOLECULAR**

**DIRECTORES:**

**Dra. Dña. Julia Buján Varela**

**Dr. D. Natalio García Honduvilla**

**ALBERTO CIFUENTES NEGRETE**

**2015**



***“Everything should be made as simple  
as possible, but no simpler.”***

Albert Einstein (1879-1955)



***A mi familia.***

***A mis amigos.***

***A Verónica.***



***Esta Tesis Doctoral está dedicada a la memoria de  
D. Germán Arribas Herráez.***

*“A las aladas almas de las rosas  
del almendro de nata te requiero,  
que tenemos que hablar de muchas cosas,  
compañero del alma, compañero.”*





# AGRADECIMIENTOS

A lo largo de todo el recorrido, han sido muchas las personas que me han brindado su ayuda y apoyo. Sin su contribución, directa o indirecta, jamás habría logrado llegar a este punto, y quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a todas ellas.

En primer lugar, a la Dra. Julia Buján y al Dr. Natalio García, directores de esta Tesis Doctoral, por la posibilidad que me ofrecieron de realizar este trabajo bajo su tutela e introducirme en el mundo de la investigación científica. Durante todos estos años, su ejemplo ha sido el origen de lo que he aprendido sobre investigación y docencia, y la confianza, paciencia, afecto y apoyo que siempre me han mostrado han hecho que para mí sean mucho más que mis directores.

Al Dr. Juan Manuel Bellón, por permitirme formar parte de su equipo, por el interés y la ayuda que me ha brindado en la realización de este trabajo, por todo lo que me ha enseñado y por ser un modelo de dedicación y perseverancia.

A la Dra. Cristina Escudero, que al depositar su confianza en mí me abrió las puertas de mi vida actual, y sin quien nada de esto hubiera sido posible.

Al Dr. Alain-Pierre Gadeau, a la Dra. Marie-Ange Renault y a todo el equipo de la Unidad 1034 del INSERM en Burdeos, por darme la oportunidad de unirme a su equipo y por la cálida acogida durante mi estancia en su laboratorio.

A la Dra. María del Carmen Gianonatti, que desde el primer día me brindó su cariño y confianza, y de la que tanto aprendí.

A la Dra. Gemma Pascual, a la Dra. Marta Rodríguez, a la Dra. Bárbara Pérez, a la Dra. Sandra Sotomayor, a Soraya Martínez-Alcocer, a Diana González, a Paloma Pérez, a Claudia Mesa y a Eva del Castillo, con las que comparto el día a día en el laboratorio. Podría escribir páginas y páginas con todo lo que tengo que agradecerle a cada una de ellas, por toda la ayuda, apoyo y amistad que me han ofrecido durante estos años y por soportar estoicamente mis manías, humores y sonidos de diversa índole.

A la Dra. Cynthia Trejo, a Javier Martín, a Cristina Miguel, a Carlos Vives y a Elena Minayo, porque aunque ya no estén con nosotros en el laboratorio, nunca se han ido.

A los excelentes profesionales del Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá, por la ayuda ofrecida durante el desarrollo de este trabajo.

A mi familia, por ser los puntales de mi vida y por su amor y su apoyo incondicionales, incluso cuando menos lo merecía. Todo lo bueno que pueda haber en la persona que soy se lo debo a ellos.

A mi madre, que me lo ha dado todo, y a quien después de haberle proporcionado tantos disgustos ya es hora de darle alguna alegría.

A mi padre y a Sonsoles, que siempre han estado ahí para mí y me han apoyado en cualquier circunstancia.

A mi hermano, que siempre ha sido mi pilar y mi referente, y del que no podría estar más orgulloso.

A mis abuelas, a las que tanto quiero y tanto debo, y que están deseando que las deje llamarme doctor de una vez, y a mi abuelo, porque sé que si pudiera verme estaría orgulloso, como siempre se sintió de mí.

A mis padrinos, a mis tíos y a mis primos, por todo lo que me quieren y se preocupan, y porque siempre confiaron en mí a pesar de que no siempre se lo puse fácil.

A mis suegros y mi cuñado, por ser mi familia lejos de mi familia.

A todos los amigos que he tenido la suerte de encontrar a lo largo del camino, con los que tantas cosas he aprendido y vivido, y junto a los que me he forjado como persona. A mis amigos de siempre, que me conocieron cuando aún tenía pelo y que me han acompañado durante todos estos años, estuvieran presentes o no. A mis compañeros de Biología y Bioquímica, sin quienes jamás habría logrado terminar las carreras. A los amigos que he ido encontrando en mis andaduras por Ávila, Salamanca, Valencia, Madrid y Alcalá, que siempre formarán parte de mi vida. A todos los vianderos y vianderas, porque la Vianda Manda. Y a todos aquellos que no se sientan identificados con ninguna de las anteriores alusiones, o piensen que me he olvidado de ellos, porque se equivocan.

A Germán, que siempre alimentó mi vocación científica, y a quien nunca dejaré de añorar. Mucho nos quedó pendiente y aunque nunca pudo verla terminada, esta Tesis Doctoral es tan suya como mía.

Y, por supuesto, a Verónica, por todo, a todos los niveles. Gracias por creer en mí, por tu paciencia y comprensión, por tu ayuda y apoyo constantes, por tu compañía y tu amor. Porque nada de lo que pudiera escribir sería suficiente para expresar todo lo que haces por mí, y porque tres puntos son mucho más que unos puntos suspensivos.



# ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ABREVIATURAS.....</b>  | <b>17</b> |
| <b>RESUMEN .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>SUMMARY.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>1.1 LA PIEL.....</b>   | <b>41</b> |
| 1.1.1 Epidermis.....  | 42        |
| 1.1.2 Dermis.....   | 46        |
| 1.1.3 Hipodermis (tejido subcutáneo).....                           | 51        |
| 1.1.4 Vascularización, inervación y anexos cutáneos (faneras) ..... | 51        |
| 1.1.5 Funciones de la piel .....                                    | 52        |
| <b>1.2 CICATRIZACIÓN CUTÁNEA .....</b>                              | <b>53</b> |
| 1.2.1 Hemostasia y coagulación .....                                | 56        |
| 1.2.2 Inflamación .....   | 56        |
| 1.2.3 Epitelización.....  | 58        |
| 1.2.4 Formación de tejido de granulación.....                       | 59        |
| 1.2.5 Neovascularización .....                                      | 60        |
| 1.2.6 Contracción y reorganización de la matriz extracelular .....  | 60        |
| <b>1.3 ALTERACIONES DEL PROCESO DE CICATRIZACIÓN:</b>               |           |
| <b>CICATRIZACIÓN COMPROMETIDA .....</b>                             | <b>61</b> |
| 1.3.1 Desórdenes de la cicatrización .....                          | 62        |
| 1.3.2 Diabetes y cicatrización: úlceras asociadas a diabetes .....  | 65        |
| 1.3.3 Terapias para la cicatrización comprometida .....             | 68        |
| <b>1.4 FACTORES DE CRECIMIENTO Y CITOQUINAS EN LA</b>               |           |
| <b>CICATRIZACIÓN .....</b>  | <b>71</b> |
| 1.4.1 PDGF .....  | 71        |
| 1.4.2 TGF- $\beta$ .....  | 72        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 1.4.3      | VEGF.....   | 73         |
| 1.4.4      | FGF.....  | 74         |
| 1.4.5      | EGF.....  | 75         |
| 1.4.6      | Citoquinas.....   | 75         |
| 1.4.7      | Otros.....  | 77         |
| <b>1.5</b> | <b>MODELOS EXPERIMENTALES DE CICATRIZACIÓN.....</b>       | <b>77</b>  |
| 1.5.1      | Modelos de cicatrización comprometida.....                | 79         |
| <b>1.6</b> | <b>HEPARINAS.....</b>                                     | <b>80</b>  |
| 1.6.1      | Heparina no fraccionada.....                              | 80         |
| 1.6.2      | Heparinas de bajo peso molecular.....                     | 81         |
| 1.6.3      | Heparinas y cicatrización.....                            | 82         |
| <b>1.7</b> | <b>BIOMATERIALES.....</b>                                 | <b>83</b>  |
| 1.7.1      | Tipos de biomateriales.....                               | 83         |
| 1.7.2      | Quitosano.....  | 84         |
| <b>2</b>   | <b><i>HIPÓTESIS DE TRABAJO.....</i></b>                   | <b>89</b>  |
| <b>3</b>   | <b><i>MATERIAL Y MÉTODOS.....</i></b>                     | <b>93</b>  |
| <b>3.1</b> | <b>PREPARACIÓN DE LOS HIDROGELES.....</b>                 | <b>93</b>  |
| 3.1.1      | Reactivos.....  | 93         |
| 3.1.2      | Protocolo de preparación.....                             | 94         |
| <b>3.2</b> | <b>EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....</b>                        | <b>96</b>  |
| 3.2.1      | Animal de estudio.....                                    | 96         |
| 3.2.2      | Grupos experimentales.....                                | 97         |
| 3.2.3      | Inducción y comprobación de la diabetes experimental..... | 97         |
| 3.2.4      | Procedimiento quirúrgico.....                             | 100        |
| 3.2.5      | Sacrificio y recogida de muestras.....                    | 102        |
| <b>3.3</b> | <b>ESTUDIOS MORFOMÉTRICOS.....</b>                        | <b>102</b> |
| 3.3.1      | Evolución del peso de los animales.....                   | 102        |
| 3.3.2      | Análisis morfométrico de la evolución del defecto.....    | 102        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| <b>3.4</b> | <b>ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.....</b>   | <b>104</b> |
| 3.4.1      | Procedimientos histológicos y tinciones .....   | 104        |
| 3.4.2      | Valoración histológica .....  | 106        |
| 3.4.3      | Análisis micromorfométrico del tejido cicatrizal.....   | 107        |
| <b>3.5</b> | <b>ESTUDIOS INMUNOHISTOLÓGICOS.....</b>   | <b>108</b> |
| 3.5.1      | Protocolos inmunohistológicos .....   | 108        |
| 3.5.2      | Anticuerpos empleados.....  | 110        |
| 3.5.3      | Evaluación y análisis de las muestras .....   | 111        |
| <b>3.6</b> | <b>ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....</b>  | <b>111</b> |
| 3.6.1      | Extracción de RNA .....   | 111        |
| 3.6.2      | Transcripción inversa.....  | 112        |
| 3.6.3      | Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR) .....                                  | 113        |
| <b>3.7</b> | <b>ESTUDIOS SEROLÓGICOS .....</b>   | <b>116</b> |
| 3.7.1      | Obtención de suero sanguíneo.....   | 116        |
| 3.7.2      | ELISA .....   | 116        |
| <b>3.8</b> | <b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>   | <b>116</b> |
| <b>4</b>   | <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>119</b> |
| <b>4.1</b> | <b>RESULTADOS MACROSCÓPICOS .....</b>   | <b>119</b> |
| 4.1.1      | Evolución del peso de los animales.....   | 119        |
| 4.1.2      | Análisis morfométrico del defecto .....   | 121        |
| <b>4.2</b> | <b>ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.....</b>   | <b>124</b> |
| 4.2.1      | Valoración histológica .....  | 124        |
| 4.2.2      | Análisis micromorfométricos del tejido cicatrizal .....   | 148        |
| 4.2.3      | Valoración de la respuesta mastocitaria .....   | 150        |
| <b>4.3</b> | <b>ESTUDIOS INMUNOHISTOLÓGICOS.....</b>   | <b>153</b> |
| 4.3.1      | Detección de $\alpha$ SMA: valoración de la neovascularura y presencia<br>miofibroblástica..... | 153        |
| 4.3.2      | Análisis de la presencia de macrófagos y subpoblaciones macrofágicas                            | 159        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| <b>4.4</b> | <b>ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....</b>                                | <b>169</b> |
| 4.4.1      | Validación de los cebadores diseñados.....                                  | 169        |
| 4.4.2      | Expresión de los genes de interés .....                                     | 170        |
| <b>4.5</b> | <b>ESTUDIOS SEROLÓGICOS .....</b>   | <b>175</b> |
| <b>5</b>   | <b><i>DISCUSIÓN</i>.....</b>  | <b>179</b> |
| 5.1        | COMPOSICIÓN Y ELABORACIÓN DE LOS HIDROGELES.....                            | 179        |
| 5.2        | MODELO EXPERIMENTAL EMPLEADO .....  | 180        |
| 5.3        | EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL PROCESO<br>DE CICATRIZACIÓN .....               | 183        |
| 5.4        | COMPONENTE INFLAMATORIO .....   | 186        |
| 5.5        | PROLIFERACIÓN Y REMODELACIÓN TISULAR .....                                  | 195        |
| 5.6        | VALORACIÓN GLOBAL DE LA CICATRIZACIÓN .....                                 | 203        |
| 5.7        | TERAPIAS EMPLEADAS PARA LA MEJORA DE LA CICATRIZACIÓN<br>COMPROMETIDA ..... | 206        |
| 5.8        | CONSIDERACIONES FINALES .....   | 217        |
| <b>6</b>   | <b><i>CONCLUSIONES</i>.....</b>   | <b>223</b> |
| <b>7</b>   | <b><i>CONCLUSIONS</i>.....</b>  | <b>227</b> |
| <b>8</b>   | <b><i>BIBLIOGRAFÍA</i>.....</b>   | <b>231</b> |



# **ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

|               |   |
|---------------|---|
| $\alpha$ SMA  | $\alpha$ -actina de músculo liso  |
| AGEs          | Productos de glicación avanzada   |
| BMP           | Proteína morfogenética ósea   |
| CMC           | Carboximetilcelulosa  |
| Col-I         | Colágeno tipo I   |
| Col-III       | Colágeno tipo III   |
| CTGF          | Factor de crecimiento de tejido conectivo   |
| EGF           | Factor de crecimiento epidérmico  |
| FBGC          | Célula gigante de cuerpo extraño  |
| FGF1          | Factor de crecimiento fibroblástico 1 (ácido)   |
| FGF2          | Factor de crecimiento fibroblástico 2 (básico)  |
| FGF7          | Factor de crecimiento fibroblástico 7 (Factor de crecimiento de queratinocitos o KGF) |
| FGFR          | Receptor del factor de crecimiento fibroblástico                                      |
| GAG           | Glicosaminoglicanos   |
| GAPDH         | Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa   |
| GM-CSF        | Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos                             |
| HB-EGF        | Factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina                               |
| HGF           | Factor de crecimiento hepatocítico  |
| IFN- $\gamma$ | Interferón- $\gamma$  |

---

|               |   |
|---------------|---|
| IGF           | Factor de crecimiento similar a insulina                  |
| IL            | Interleuquina   |
| iNOS          | Óxido nítrico sintasa inducible                           |
| LMWH          | Heparina de bajo peso molecular                           |
| MCP-1         | Proteína quimiotáctica de monocitos-1                     |
| MFb           | Miofibroblasto  |
| MMP           | Metaloproteasas matriciales                               |
| NGF           | Factor de crecimiento nervioso                            |
| PDGF          | Factor de crecimiento derivado de plaquetas               |
| PGF           | Factor de crecimiento placentario                         |
| RAGE          | Receptor de productos de glicación avanzada               |
| ROS           | Especies reactivas del oxígeno                            |
| STZ           | Estreptozotocina  |
| TGF- $\alpha$ | Factor de crecimiento transformante- $\alpha$             |
| TGF- $\beta$  | Factor de crecimiento transformante- $\beta$              |
| TIMP          | Inhibidores tisulares de las metaloproteasas              |
| TNF- $\alpha$ | Factor de necrosis tumoral- $\alpha$                      |
| UFH           | Heparina no fraccionada                                   |
| VEGF          | Factor de crecimiento del endotelio vascular              |
| VEGFR         | Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular |

# RESUMEN



## RESUMEN

La cicatrización comprende una serie compleja y dinámica de procesos, en los que se encuentran implicados mediadores solubles, células inflamatorias, matriz extracelular y células del parénquima. Clásicamente, estos procesos se engloban dentro de tres fases principales que se solapan en el tiempo: fase inflamatoria, fase proliferativa o de formación tisular y fase de maduración o remodelación tisular. Dentro de la reparación cutánea, especialmente en el caso de lesiones que comprenden el grosor total de la piel, tienen gran relevancia los procesos de infiltración leucocitaria, formación de tejido de granulación, reepitelización, fenómenos de contracción, síntesis de nueva matriz y maduración tisular.

Estos procesos, ya de por sí comprometedores para el organismo, pueden verse afectados negativamente por otras situaciones o afecciones, como pueden ser la hipoxia tisular, el estrés oxidativo, la infección, las medicaciones, las carencias nutricionales, los tumores, la edad, los factores ambientales y los desórdenes metabólicos. Aquellas heridas que no consiguen progresar satisfactoriamente a través de las fases normales de curación se convierten en heridas crónicas, las cuales muestran un estado patológico de inflamación persistente. Estas heridas presentan grandes índices de prevalencia y causan elevados costes sanitarios, siendo la mayoría de estas úlceras causadas por isquemia secundaria a estasis venosa, presión o diabetes mellitus.

Dentro de las complicaciones más habituales en los procesos de cicatrización, la patología de las úlceras asociadas a diabetes (pie de diabético) tiene una gran relevancia clínica. Estos pacientes presentan graves problemas a la hora de cicatrizar lesiones cutáneas, produciéndose muy frecuentemente úlceras crónicas con graves implicaciones sanitarias, que en muchos casos acaban en amputación. La cicatrización comprometida que presentan los individuos afectados por la diabetes mellitus, tanto de tipo I como de tipo II, es debida a múltiples factores, entre los que se incluyen vasculopatías, neuropatías, infecciones, isquemia, así como otras complicaciones a nivel celular/molecular, tales como estrés oxidativo o proteólisis descontrolada, entre otras. Asimismo, tienen especial importancia los procesos de acumulación de

productos de glicosilación avanzada causados por la hiperglicemia, así como la disfunción de varios tipos celulares implicados en la reparación, entre los que se incluyen fibroblastos y células del sistema inmune como macrófagos, neutrófilos y otras células inflamatorias.

Tanto a nivel clínico como experimental, existen múltiples terapias para mejorar la cicatrización comprometida. Dentro de ellas, el uso de glicosaminoglicanos representa una buena opción para tratar heridas crónicas. La heparina, un glicosaminoglicano habitualmente empleado como anticoagulante, ha sido estudiado como posible agente potenciador del cierre de heridas, gracias a su capacidad para unirse y proteger de la proteólisis y otras modificaciones a factores de crecimiento claves para la cicatrización. La heparina sin fraccionar comparte estas características con sus derivados, las heparinas de bajo peso molecular, las cuales presentan efectos más predecibles y un uso clínico más seguro. Entre ellas, la bemiparina presenta un excelente perfil farmacológico, destacando por su menor peso molecular y mayor seguridad.

Para obtener los mejores resultados sobre estas úlceras sería conveniente emplear agentes de aplicación tópica, de manera que su actuación y efectos se produzcan de forma local y delimitada. Además, este tipo de lesiones mejoran claramente su proyección cuando se emplea un dispositivo que proteja la herida y favorezca un ambiente adecuado para su correcta cicatrización. Los apósitos más recomendables son los que cumplen las condiciones de ser biodegradables, biocompatibles y bioactivos. Una de las opciones más prometedoras y que mejores resultados ha dado hasta la fecha para la fabricación de este tipo de dispositivos es el uso de polímeros naturales, entre los que cabe destacar el quitosano, un biopolímero obtenido por desacetilación de la quitina. Este material puede ser utilizado en conjunción con las distintas heparinas para desarrollar sistemas funcionalizados, para lo que se aprovecha la diferencia de cargas que presentan ambos polímeros. El quitosano resulta particularmente apropiado para su aplicación en heridas crónicas, ya que puede ser preparado en distintas presentaciones (películas, hidrogeles, membranas, etc.) y presenta por sí mismo propiedades beneficiosas para el proceso de cicatrización, más allá de servir como andamiaje y liberador de sustancias.



Contemplando todo lo expuesto, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

*Es posible modular la cicatrización comprometida asociada a la diabetes mediante el empleo de hidrogeles de quitosano funcionalizados con heparina de bajo peso molecular y heparina no fraccionada, en un modelo experimental de cicatrización en rata diabética.*

Para llevar a cabo el contraste de esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudio del efecto de la aplicación de hidrogeles de quitosano cargados con heparinas en un modelo experimental de cicatrización de defecto excisional en rata diabética inducida por estreptozotocina, analizando el proceso cicatrizal y su evolución a lo largo del tiempo.
- Valoración de la efectividad de los tratamientos aplicados, atendiendo a la respuesta inflamatoria, formación de nuevo tejido y maduración tisular, y comparación entre los distintos tipos de heparina.

Para la consecución de estos objetivos, se diseñaron hidrogeles basados en quitosano para su posterior aplicación sobre defectos cutáneos. Tras realizar diversas pruebas con diferentes combinaciones de ingredientes y protocolos de preparación, se fabricaron tres tipos de hidrogel de quitosano al 2%: cargados con un 0,2% de heparina sin fraccionar, cargados con un 0,2% de bemiparina e hidrogeles sin heparina (placebo). En estas preparaciones se incluyeron glicerol y carboximetilcelulosa para mejorar sus propiedades físicas, metil- y propil-parabeno como preservantes y  $\text{NaHCO}_3$  como neutralizador de acidez. Los hidrogeles obtenidos presentaron unas propiedades adecuadas para su aplicación, en cuanto a su estabilidad y facilidad de administración.

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se escogió un modelo de cicatrización en rata diabética inducida por estreptozotocina. La administración intraperitoneal de este compuesto provocó el desarrollo de la patología diabética mediante destrucción selectiva de las células  $\beta$  del páncreas. La aparición de la diabetes fue confirmada por la observación de síntomas clásicos (polidipsia, polifagia y poliuria), pérdida de peso, altos niveles de glucosa en orina y el análisis histológico del páncreas.

Como animal de estudio se emplearon ratas Wistar hembras con pesos comprendidos entre 183 y 260 g. Los animales (n=120) fueron distribuidos aleatoriamente en cinco grupos de estudio de la manera siguiente:

- CTRL-S: ratas control no diabéticas, sin tratamiento.
- CTRL-D: ratas control diabéticas, sin tratamiento.
- PLCB: ratas diabéticas tratadas con hidrogel sin heparina (placebo).
- HEP: ratas diabéticas tratadas con hidrogel con heparina no fraccionada.
- BEM: ratas diabéticas tratadas con hidrogel con bemiparina.

Se realizó en el dorso de todos los animales un defecto excisional de grosor total circular, con un diámetro de 1,5 cm, tras lo cual a los animales pertenecientes a los grupos PLCB, HEP y BEM les fue administrado el hidrogel correspondiente. Seis animales de cada grupo de estudio fueron sacrificados a los 3, 7, 14 y 21 días de la realización del defecto, y se tomaron muestras sanguíneas y del tejido cicatrizal, así como fotografías del área de la herida.

La evolución del área del defecto a lo largo del tiempo mostró una distensión de la herida a día 3. La reducción del área abierta ocurrió de manera más rápida en el grupo CTRL-S, mostrando diferencias estadísticamente significativas en su valor medio a 7 días frente a CTRL-D ( $p \leq 0,05$ ) y PLCB ( $p \leq 0,01$ ). En este tiempo de estudio, los grupos HEP y BEM alcanzaron valores menores que CTRL-D y PLCB, aunque mayores que CTRL-S. En el día 14, estas diferencias fueron más reducidas, sin alcanzar la significatividad estadística. Finalmente, los cinco grupos mostraron valores medios similares a día 21. Se observó en todos los casos una gran contracción de la herida, cuya contribución sobre el total del cierre fue proporcionalmente mayor que la aportada por el proceso de epitelización, con valores medios globales del 80,8% y el 12,8%, respectivamente.

Las observaciones histológicas en los distintos tiempos de estudio mostraron diferencias en el avance del proceso cicatrizal entre los cinco grupos experimentales.

A día 3, los cuatro grupos de ratas diabéticas presentaron una inflamación más elevada que el control sano. En el grupo CTRL-D se observó una menor generación de nueva matriz y un sellado de los bordes deficiente comparado con CTRL-S. Los grupos

tratados con hidrogeles mostraron una mejor respuesta en el sellado, así como un tejido central con aspecto menos reseco y dañado que los grupos control.

En el día 7 pudo observarse en el grupo CTRL-S la formación de un tejido de granulación acompañado de angiogénesis, síntesis de colágeno y el comienzo de la reepitelización. CTRL-D mostró una mayor inflamación, colagenización reducida y un avance epitelial alterado. El grupo PLCB no presentó cambios en la epitelización con respecto a CTRL-D, aunque se observó una mejor granulación. En los grupos HEP y BEM se vio un tejido más organizado y menos inflamado que en CTRL-D, con mayor presencia de colágeno y un nuevo epitelio más grueso y similar al del grupo CTRL-S.

A día 14, todos los grupos mostraron una gran contracción tisular. CTRL-S presentó un tejido neoformado alineado y menos celular que en tiempos anteriores, debido a la reducción de la inflamación tisular, con un gran aumento de la presencia de colágeno. En el grupo CTRL-D se observó un tejido incipiente de menor grosor y con peor organización. La presencia de células inflamatorias fue muy superior al control sano, al contrario que la colagenización, que se vio reducida. El nuevo epitelio mostró un menor grosor y una estratificación alterada. El grupo PLCB presentó resultados similares a CTRL-D, mientras que los grupos HEP y BEM mejoraron esta respuesta. Ambos grupos mostraron una neoepidermis gruesa y correctamente estratificada, avanzando sobre el nuevo tejido, y una inflamación tisular más moderada, especialmente el grupo HEP. Asimismo, la acumulación de colágeno en estos dos grupos fue superior a la observada en CTRL-D y PLCB.

En el día 21 el grupo CTRL-S mostró un tejido cicatrizal en proceso de maduración, con una gran presencia de colágeno, vasculatura en regresión y celularidad reducida. Por el contrario, CTRL-D presentó un aspecto de inflamación crónica, así como un tejido de menor grosor y colagenización reducida. Aunque el avance de la epitelización fue similar, se observó una nueva epidermis más delgada que la de los controles sanos. El grupo PLCB mostró resultados heterogéneos, con un tejido de nueva formación más organizado alternando zonas de elevada inflamación con otras de menor celularidad. El grupo HEP presentó una menor inflamación tisular que CTRL-D y PLCB, aunque se encontraron focos con fuerte reacción a cuerpo extraño. De manera similar, en el

grupo BEM se observó una respuesta inflamatoria más moderada, excepto en las zonas más superficiales sin epitelizar o junto a cuerpos extraños. Ambos grupos mostraron una mejor colagenización y organización de la nueva matriz comparados con CTRL-D y PLCB, y el grosor del tejido cicatrizal fue significativamente mayor (HEP vs. PLCB:  $p \leq 0,05$ ; BEM vs. PLCB, HEP vs. CTRL-D:  $p \leq 0,01$ ; BEM vs. CTRL-D:  $p \leq 0,001$ ).

La valoración de la respuesta mastocitaria mediante tinción con azul de toluidina mostró un aumento de estas células en los bordes del defecto tras la lesión y una lenta colonización del tejido neoformado a partir del día 7. En el grupo CTRL-D se observó una menor presencia de mastocitos en los bordes y una colonización del nuevo tejido disminuida. Esta diferencia desapareció en los grupos HEP y BEM, que mostraron una respuesta similar a CTRL-S.

La inmunodetección de  $\alpha$ -actina de músculo liso permitió valorar la presencia y distribución de los miofibroblastos a lo largo del tiempo. Los grupos CTRL-D y PLCB mostraron una peor organización y alineamiento de estas células. A día 14, se observó una disminución del número de miofibroblastos en el grupo CTRL-S, mientras que los niveles en los grupos diabéticos fueron aún elevados. Tras 21 días, CTRL-S mostró una tendencia a la desaparición de estas células, mientras que en CTRL-D se observó una elevada persistencia. En el grupo PLCB se vio una reducción en el número de células marcadas, siendo este descenso más pronunciado en los grupos HEP y BEM, aunque menor que el ocurrido en CTRL-S. La inmunodetección de este marcador también fue empleada para valorar la neovascularización. En todos los grupos se produjo un aumento del número de vasos entre los días 7 y 14, sin observarse diferencias entre ellos. Sin embargo, a día 21 CTRL-S mostró una gran reducción de la vasculatura, mientras que CTRL-D y PLCB mantuvieron valores similares a los observados a 14 días ( $p \leq 0,001$  vs. CTRL-S). Los grupos HEP y BEM presentaron una tendencia a la reducción de la red vascular, con resultados intermedios entre CTRL-S y CTRL-D/PLCB, los cuales fueron significativos ( $p \leq 0,05$ ) en todas las comparaciones entre HEP y BEM con el resto de los grupos.

La presencia de macrófagos y la proporción del fenotipo M2 se analizó mediante inmunodetección de CD68 y marcaje doble de CD68/CD206 por inmunofluorescencia.

Mientras que el grupo CTRL-S mostró una reducción en el número total de macrófagos a partir del día 14, los grupos diabéticos mantuvieron niveles elevados hasta el día 21. Sin embargo, el porcentaje del fenotipo M2, asociado a reparación tisular, fue significativamente inferior ( $p \leq 0,05$ ) en los grupos CTRL-D y PLCB frente al resto de los grupos, observándose estas diferencias desde el día 7. En el día 21, CTRL-S, HEP y BEM mostraron porcentajes similares entre ellos y significativamente mayores que CTRL-D ( $p \leq 0,05$ ) y PLCB ( $p \leq 0,01$ ).

El análisis de la expresión de citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10) en el tejido cicatrizal mediante qPCR mostró patrones temporales de inducción y remisión, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Su cuantificación en suero mediante ELISA reveló niveles por debajo del límite de detección para las cuatro citoquinas ([TNF- $\alpha$ ] < 4 pg/mL; [IFN- $\gamma$ ] < 13 pg/mL; [IL-6] < 5 pg/mL; [IL-10] < 5 pg/mL), lo que se corresponde con los niveles esperados en condiciones normales. La expresión génica de los factores de crecimiento FGF2, VEGF-A y TGF- $\beta$ 1 y de los colágenos tipo I y III no mostró diferencias entre los grupos de estudio, observándose patrones temporales de expresión similares en estos tres últimos genes, alcanzando un máximo una semana tras la lesión.

En términos generales, los grupos control diabético y placebo mostraron un retraso en el proceso cicatrizal y una menor calidad del mismo al compararlos con la cicatrización observada en el grupo control sano. El tratamiento con hidrogeles de quitosano cargados con ambos tipos de heparina lograron mejorar la respuesta reparativa asociada a la diabetes, rompiendo el estancamiento inflamatorio del proceso y favoreciendo su progresión hacia las fases proliferativa y de remodelación. La participación de los apósitos empleados en la obtención de estos mejores resultados resulta clara, propiciando un ambiente húmedo, limitando la inflamación, y favoreciendo la formación del tejido de granulación y su maduración.

Los hidrogeles diseñados en el presente trabajo podrían suponer una importante contribución para el tratamiento de estas lesiones. La ausencia de componentes que requieran una consideración especial para su uso, como células o factores de crecimiento, su fácil aplicación y adaptabilidad a las distintas heridas, así como su coste

reducido hacen que estos dispositivos presenten una serie de ventajas frente a otras terapias avanzadas. Debido a ello, se presentan como grandes candidatos para su aplicación en el tratamiento general de las úlceras asociadas a diabetes.

Debido a la ausencia de diferencias en la acción beneficiosa sobre el proceso cicatrizal de los hidrogeles funcionalizados con heparina sin fraccionar y con bemiparina, la elección de uno de los tipos de heparina sería consecuencia de las propiedades de las mismas. Las heparinas de bajo peso molecular, y especialmente la bemiparina, poseen características ventajosas sobre las heparinas no fraccionadas, como una actividad más estable y predecible o un menor riesgo de complicaciones como la hemorragia o la trombocitopenia inducida por heparina. Por ello, la elección entre los dos sistemas empleados en este trabajo de Tesis Doctoral sería el uso de hidrogeles funcionalizados con bemiparina, frente a los cargados con heparina sin fraccionar.

De los resultados obtenidos podemos extraer las siguientes **conclusiones**:

- Los hidrogeles de quitosano cargados con heparina no fraccionada o con bemiparina provocan una mejora de los procesos de cicatrización comprometida asociada a diabetes en el modelo experimental utilizado: favorecen la remisión de la inflamación, promueven el avance del proceso reparativo e inducen la formación de un tejido cicatrizal de mayor calidad.
- El efecto beneficioso observado sobre la cicatrización tras la aplicación de hidrogeles de quitosano cargados con bemiparina o con heparina no fraccionada es similar.

Estas conclusiones nos permiten, por tanto, elevar nuestra **hipótesis** a la categoría de **TESIS**, afirmando que:

*El empleo de hidrogeles de quitosano funcionalizados con bemiparina (heparina de bajo peso molecular) y heparina no fraccionada mejoran la cicatrización comprometida asociada a la diabetes en un modelo experimental de cicatrización en rata diabética.*

## SUMMARY





## SUMMARY

Wound healing includes complex and dynamic processes, which involves many factors, such as soluble mediators, inflammatory cells, extracellular matrix and parenchymal cells. Classically, these events are grouped into three main overlapping phases: inflammatory phase, proliferative phase and maturation/remodeling phase. In cutaneous repair, especially in full-thickness injuries, the processes of leukocyte infiltration, granulation tissue formation, re-epithelialization, contraction, new matrix deposition and tissue maturation have great relevance.

These events, which compromise the organism by themselves, can be also negatively influenced by other conditions or affections, such as tissue hypoxia, oxidative stress, infection, drugs, nutritional deficiencies, tumors, age, environmental factors and metabolic disorders. The wounds that fail in progressing satisfactorily through the normal phases of healing become chronic wounds, which display a pathological persistent inflammation. These injuries show high prevalence and are tremendously costly for the healthcare system, being most of these ulcers caused by ischemia secondary to venous stasis, pressure or diabetes mellitus.

Among the most common complications of wound healing, diabetic ulcer pathology (diabetic foot) has great clinical relevance. Patients suffering from this pathology show serious problems in the cicatrization of cutaneous injuries, frequently developing chronic ulcers. These wounds represent an important sanitary issue, and often lead to the amputation of lower limbs. The impairment of wound healing suffered by diabetic patients is due to multiple factors, including vasculopathies, neuropathies, infection, ischemia, and other cellular and molecular complications, such as oxidative stress and uncontrolled proteolysis among others. In addition, other important processes are the accumulation of advanced glycation end-products caused by hyperglycemia and the dysfunction of several cell types involved in tissue repair, including fibroblasts, macrophages, neutrophils and other inflammatory cells.

At both clinical and experimental levels, multiple therapies have been designed in an attempt to improve impaired healing. Among them, the use of glycosaminoglycans

represents a good option for treating chronic wounds. Heparin, a type of glycosaminoglycan commonly used as anticoagulant, has been proposed as a wound healing enhancer, due to its ability to interact with key growth factors and protect them from proteolysis and other modifications. Unfractionated heparin shares this features with its derivatives, low molecular weight heparins, which display more predictable effects and a safer clinical usage. Bemiparin, a low molecular weight heparin, stands out because of its lower molecular weight and greater safety, presenting an excellent pharmacological profile.

To achieve the best results, topical agents should be used upon these ulcers, promoting local and delimited effects. In addition, this kind of injuries show better outcomes when a protective device is applied, favoring an adequate environment for a correct cicatrization. Ideal dressings should be biodegradable, biocompatible and bioactive. To date, one of the most promising options to be used in the manufacturing of this kind of devices are natural polymers, especially chitosan, a biopolymer obtained by deacetylation of chitin. This material can be used together with heparins to develop functionalized systems, taking advantage of the different ionic charges that both polymers present. Chitosan turns to be particularly appropriate to be applied upon chronic wounds, considering that it can be formulated as films, hydrogels, membranes sponges, etc., and displays beneficial properties on wound healing by itself, beyond acting as scaffold and drug delivery system.

Considering all these facts, we propose the following working hypothesis:

*It is possible to modulate diabetes-associated impaired wound healing by the application of chitosan hydrogels functionalized with low molecular weight heparin and unfractionated heparin, in an experimental wound healing model in diabetic rats.*

To test this hypothesis, the following objectives were set:

- Study of the effect of topically applied heparin-functionalized chitosan hydrogels in an experimental wound healing model of full-thickness excisional defect in streptozotocin-induced diabetic rats, analyzing the reparative process and its progression over time.

- Assessment of the effectiveness of the applied treatments, regarding inflammatory response, granulation tissue formation and maturation, and comparison between both types of heparin.

To this end, chitosan-based hydrogels were designed for its application upon cutaneous defects. Different combinations of components and fabrication protocols were tested before selecting the final formula. Three alternative forms of 2% chitosan hydrogels were made: loaded with 0.2% unfractionated heparin, 0.2 % bemiparin or no heparin (placebo). These preparations included glycerol and carboxymethyl cellulose to improve their physical properties, methyl- and propyl-paraben as preservatives and  $\text{NaHCO}_3$  as acidity neutralizer. The obtained hydrogels showed adequate properties for its use, regarding stability and administration easiness.

To study the effectiveness of the chitosan hydrogels, an experimental wound healing model in streptozotocin-induced diabetic rats was used. Intraperitoneal administration of this drug allowed the development of the diabetic pathology by selective destruction of pancreatic  $\beta$  cells. Diabetes onset was confirmed by the appearance of classical symptoms (polydipsia, polyphagia and polyuria), weight loss, elevation of glucose levels in urine and histological analysis of the pancreas.

Female Wistar rats ( $n=120$ ), weighting between 183 g and 260 g were randomly divided into five study groups as follows:

- CTRL-S: non-diabetic control rats, untreated.
- CTRL-D: diabetic control rats, untreated.
- PLCB: diabetic rats treated with hydrogel without heparin (placebo).
- HEP: diabetic rats treated with unfractionated heparin-loaded hydrogel.
- BEM: diabetic rats treated with bemiparin-loaded hydrogel.

All animals underwent a circular full-thickness excisional defect (1,5 cm diameter) in the dorsum, and rats belonging to PLCB, HEP and BEM groups received the corresponding hydrogel dressing. Six animals from each group were euthanized 3, 7, 14, and 21 days after surgery, and blood and tissue samples were obtained, as well as photographs of the wound area.

The evolution of the defect area over time showed a distension of the wound at day 3. The reduction of the open area happened faster in CTRL-S group, showing statistically significant differences in its mean value vs. CTRL-D ( $p \leq 0,05$ ) and PLCB ( $p \leq 0,01$ ). At this time, HEP and BEM groups reached smaller sizes than CTRL-D and PLCB, though bigger than CTRL-S. At day 14, these differences were reduced, without reaching statistical significance. Finally, all five groups showed similar mean values at day 21. In all cases, a great contraction of the wound was observed. The contribution of this process to the closure was proportionally higher, compared to epithelialization (global mean values: 80,8% and 12,8%, respectively).

Histological observations at the four study time points revealed differences in the course of the healing process between the groups.

At day 3, the four diabetic groups presented a higher inflammation than non-diabetic control. In the CTRL-D group a reduced generation of new matrix and a deficient sealing of the borders were observed, compared with CTRL-S. The groups treated with hydrogels showed a better response in the sealing, as well as a less dry and damaged central tissue than control groups did.

At day 7, granulation tissue formation was observed in CTRL-S, accompanied by angiogenesis, collagen synthesis and the start of epithelialization. CTRL-D showed higher inflammation, reduced collagenization and an altered epithelial advance. PLCB group did not present changes in the epithelialization compared with CTRL-D, but a better granulation was observed. Compared to CTRL-D, HEP and BEM groups displayed a more organized and less inflamed tissue, with higher presence of collagen and a thicker neo-epithelium, similar to that of CTRL-S group.

At day 14, all groups showed great contraction of the new tissue. CTRL-S presented an aligned tissue, less cellular than in previous time points due to the reduction of inflammation, and a higher abundance of collagen. In CTRL-D group a thinner and less organized tissue was observed. Compared to non-diabetic control, the presence of inflammatory cells was greater and the collagenization was reduced. The new epithelium was thinner and displayed an altered stratification. PLCB group results were similar to those found in CTRL-D, while HEP and BEM groups displayed an improved

response. Both groups showed a thick and stratified neo-epidermis advancing over the new tissue, and lower levels of inflammation, especially in HEP group. Collagen deposition in these two groups was also higher than in CTRL-D and PLCB groups.

At day 21, CTRL-S group showed a maturing cicatricial tissue, with high presence of collagen, vasculature in regression and reduced cellularity. In contrast, CTRL-D group presented a chronic inflammatory state, as well as a thinner tissue and a lower collagenization. Although the advance of the epithelium was similar, a thinner new epidermis was observed, compared with non-diabetic controls. PLCB group showed heterogeneous results, with an improvement in tissue organization and alternating highly inflamed zones with others of less cellularity. Tissue inflammation in HEP group was lower than those observed in CTRL-D and PLCB groups, although some areas with strong foreign body reaction were found. Similarly, in BEM group a more moderate inflammatory response was observed, except in the most superficial areas or next to foreign bodies. Both groups achieved a better collagenization and organization of the new matrix, compared to CTRL-D and PLCB, and the thickness of the cicatricial tissue was significantly higher (HEP vs. PLCB:  $p \leq 0.05$ ; BEM vs. PLCB, HEP vs. CTRL-D:  $p \leq 0.01$ ; BEM vs. CTRL-D:  $p \leq 0.001$ ).

The assessment of the mast cell response by toluidine blue staining showed an increase in the number of these cells in the borders of the defect after the wounding, as well as a slow colonization of the new tissue since day 7. In CTRL-D group, the levels of mast cells in the borders were reduced, and a diminished colonization of the neo-formed tissue was observed. These differences disappeared in HEP and BEM groups, which showed a similar response to that observed in CTRL-S group.

Immunostaining of  $\alpha$ -smooth muscle actin was used to assess the presence and distribution of myofibroblasts over time. CTRL-D and PLCB groups showed a worse organization and alignment of these cells. At day 14, a decrease in the number of myofibroblasts in CTRL-S group was observed, while levels in the diabetic groups remained high. After 21 days, CTRL-S showed a tendency to the disappearance of these cells, whereas in CTRL-D group an elevated persistence was observed. In PLCB group a decrease in the number of stained cells was seen, while HEP and BEM showed

a higher reduction, though smaller than the one in CTRL-S. The immunostaining of this marker was also used to assess neo-vascularization. All groups showed an increase in the number of vessels between days 7 and 14, without observable differences between the groups. However, at day 21 CTRL-S showed a marked reduction of the vasculature, whereas CTRL-D and PLCB maintained values similar to those observed at day 14 ( $p \leq 0.001$  vs. CTRL-S). HEP and BEM groups showed a tendency to the retraction of the vascular network, displaying results intermediate between CTRL-S and CTRL-D/PLCB, being these differences significant ( $p \leq 0.05$ ) in all comparisons between HEP/BEM and the rest of the groups.

The presence of macrophages and the proportion of the M2 phenotype were analyzed by immunostaining of CD68 and the double immunofluorescence of CD68/CD206. While CTRL-S group showed a decrease in the total number of macrophages at day 14, the levels in diabetic groups remained high until day 21. However, the percentage of M2 phenotype, associated to tissue reparation, was significantly lower ( $p \leq 0.05$ ) in CTRL-D and PLCB compared with the rest of the groups, being observed these differences from day 7. At day 21, CTRL-S, HEP and BEM groups showed similar percentages between them, and significantly higher than CTRL-D ( $p \leq 0.05$ ) and PLCB ( $p \leq 0.01$ ).

Gene expression analysis of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-10) in the healing tissue measured by qPCR showed temporary patterns of induction and remission, although no significant differences were observed between groups. Quantification in blood serum by ELISA revealed levels below the limits of detection for these cytokines ([TNF- $\alpha$ ] < 4 pg/mL; [IFN- $\gamma$ ] < 13 pg/mL; [IL-6] < 5 pg/mL; [IL-10] < 5 pg/mL), which correspond to expected levels in normal conditions. The expression of growth factors FGF2, VEGF-A and TGF- $\beta$ 1 and of collagen type I and III did not show differences between groups, exhibiting similar temporary patterns of expression in the last three genes, which peaked at day 7.

In general terms, diabetic control and placebo groups showed an important delay of the wound healing process, as well as a poorer quality of it, when compared with non-diabetic control healing. Treatment with chitosan hydrogels functionalized with both

types of heparin achieved a significant improvement of diabetes-associated reparative response, breaking the chronic inflammatory state and favoring its progression to the proliferative and remodeling phases. The better outcomes observed when these dressings were applied can be explained by their ability to maintain a moist environment, restrict inflammation and promote granulation tissue formation and maturation.

The hydrogels designed in the present study could be an important contribution for the treatment of these lesions. The absence of components requiring special considerations for their use, like cells or exogenous growth factors, the easiness of application and adaptability to different wounds, as well as the reduced cost of these devices, make of them an advantageous alternative to other advanced therapies. Hence, these dressings could be great candidates to be used in the general treatment of diabetic ulcers.

Due to the lack of differences in the activity of hydrogels either loaded with unfractionated heparin or with bemiparin, the choice between them should be a consequence of the properties of these drugs. Low molecular weight heparins, and especially bemiparin, have advantageous properties over unfractionated heparin, including a more stable and predictable activity and a lower risk of complications, such as bleeding or heparin-induced thrombocytopenia. Therefore, the choice between the two systems described in this Doctoral Thesis would be the use of chitosan hydrogels functionalized with bemiparin.

From the results obtained, the following **conclusions** can be drawn:

- The chitosan hydrogels loaded with unfractionated heparin or with bemiparin cause an improvement in the diabetes-associated impaired wound healing processes, in this experimental model: favoring the remission of inflammation, promoting the advance of the reparative process and inducing the formation of a higher quality cicatricial tissue.
- The beneficial effect upon healing observed after the application of chitosan hydrogels loaded with bemiparin or unfractionated heparin was similar.

Based on these findings, we were able to raise our starting **hypothesis** to the category of **THESIS** and conclude that:

*The use of chitosan hydrogels functionalized with bemiparin (low molecular weight heparin) and unfractionated heparin improves the impaired wound healing associated to diabetes, in an experimental model of wound healing in the diabetic rat.*



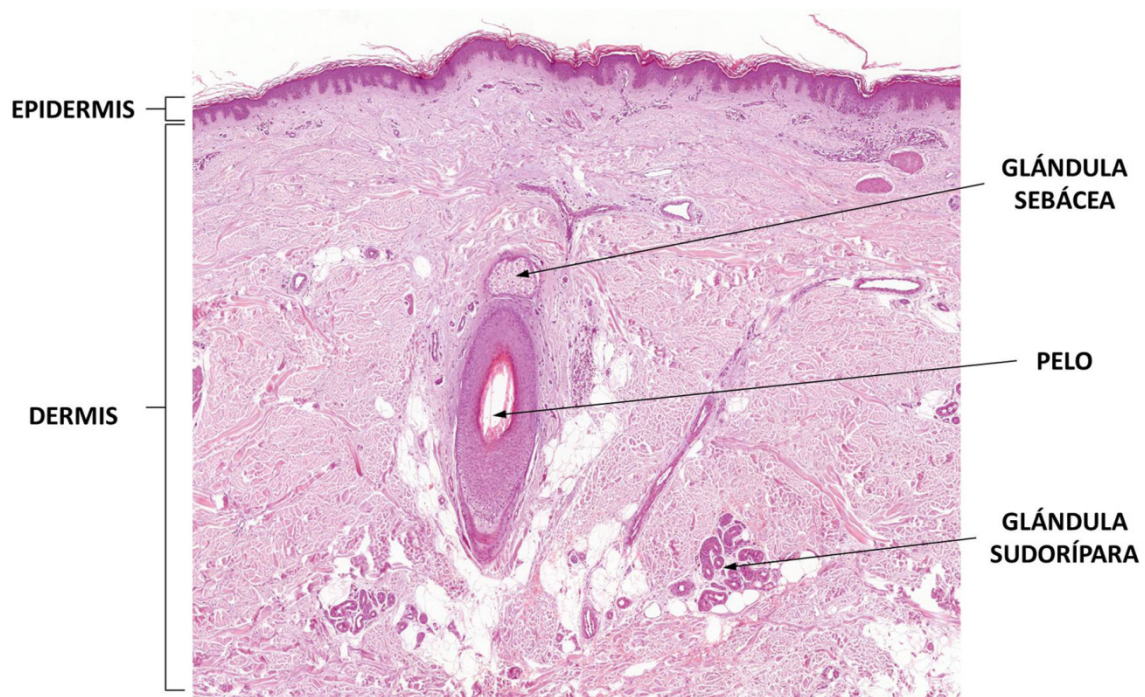
# INTRODUCCIÓN



# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 LA PIEL

La piel forma la cubierta externa del cuerpo, y es el órgano más grande ya que su peso representa entre el 15 y el 20% de la masa total de un adulto. Este órgano desempeña varias funciones, siendo una de las principales actuar como barrera de protección frente al medio externo. La piel está constituida por dos capas: **epidermis** y **dermis** (aunque algunos autores consideran tres capas, incluyendo la **hipodermis**), y junto con sus **anexos cutáneos** o **faneras** constituye el **sistema tegumentario** (Figura 1).



**Figura 1:** Microfotografía de una preparación histológica de piel humana teñida con hematoxilina-eosina. Se observan las capas de la piel, así como la presencia de anexos cutáneos.

El espesor de la piel varía desde menos de 1 mm hasta más de 5 mm, dependiendo de la región corporal. Dentro de esta variabilidad, existen regiones donde el grosor es mayor y la piel presenta características notablemente distintas, como son las palmas de las manos y las plantas de los pies. Estas zonas, que soportan una fricción intensa, poseen una capa epidérmica especialmente desarrollada y carecen de pelo, siendo denominado este tipo de piel **piel gruesa**. El resto del cuerpo presenta una piel cuya

epidermis es más delgada, que recibe el nombre de **piel fina**. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta al emplear estos términos que hacen referencia tan solo al grosor de la capa epidérmica, no al total de la piel. Efectivamente, desde el punto de vista anatómico, la piel más gruesa se encuentra en la región superior del dorso, ya que en esa región presenta una dermis de gran espesor, si bien su epidermis es comparable a la de la piel fina de otras partes de la superficie corporal (Kierszenbaum y Tres, 2012; Ross y Pawlina, 2012).

### 1.1.1 Epidermis

#### Estructura

La epidermis es la capa más externa de la piel, derivada del ectodermo. Está compuesta por un epitelio estratificado plano en continuo crecimiento, formado principalmente por **queratinocitos** en constante proliferación en las capas más profundas, que en su mayor parte sufren queratinización y desplazamiento hacia la superficie donde se desprenderán por descamación, manteniendo de este modo el espesor normal de la piel. Esta dinámica da lugar a la estructura característica en capas de la epidermis, distinguiéndose clásicamente cinco estratos, cuatro de los cuales se encuentran en todos los tipos de piel y un quinto que solamente aparece en las zonas de piel gruesa. Desde la zona profunda hasta la superficie los **estratos** son: *estrato basal*, *estrato espinoso*, *estrato granuloso*, *estrato lúcido* y *estrato córneo* (**Figura 2**).

#### **Estrato basal**

También llamado *estrato germinativo*. En él se encuentran las células madre de la epidermis, cuya actividad mitótica permite la renovación del epitelio. Consiste en una única capa celular apoyada sobre la lámina basal subyacente, de pequeño tamaño y morfología cúbica o cilíndrica baja con núcleos ovales y citoplasma basófilo. Estas células se encuentran unidas entre sí y a los queratinocitos por medio de desmosomas, y a la membrana basal mediante hemidesmosomas. A medida que se van originando nuevos queratinocitos, se van desplazando hacia el estrato siguiente.

### **Estrato espinoso**

Recibe este nombre por el aspecto que presentan a microscopía óptica sus componentes celulares con proyecciones cortas entre las células a modo de espinas, que se corresponden con las zonas de unión intercelular tipo adherente o desmosomas. Consiste en varias capas de queratinocitos de mayor tamaño que los del estrato basal, con morfología poligonal ligeramente aplanada con núcleo oval. Su citoplasma, moderadamente basófilo, presenta gránulos (*cuerpos laminares o lamelares*).

### **Estrato granuloso**

Es la capa más superficial de la porción no queratinizada de la epidermis. La forman varias capas de células aplanadas en las que se observan, además de los cuerpos laminares, gránulos característicos irregulares y muy basófilos de *queratohialina*. En estos gránulos se encuentran proteínas precursoras de *filagrina* y *trichohialina*, promotoras de la aglomeración de los filamentos de queratina. Este estrato presenta uniones estrechas intercelulares.

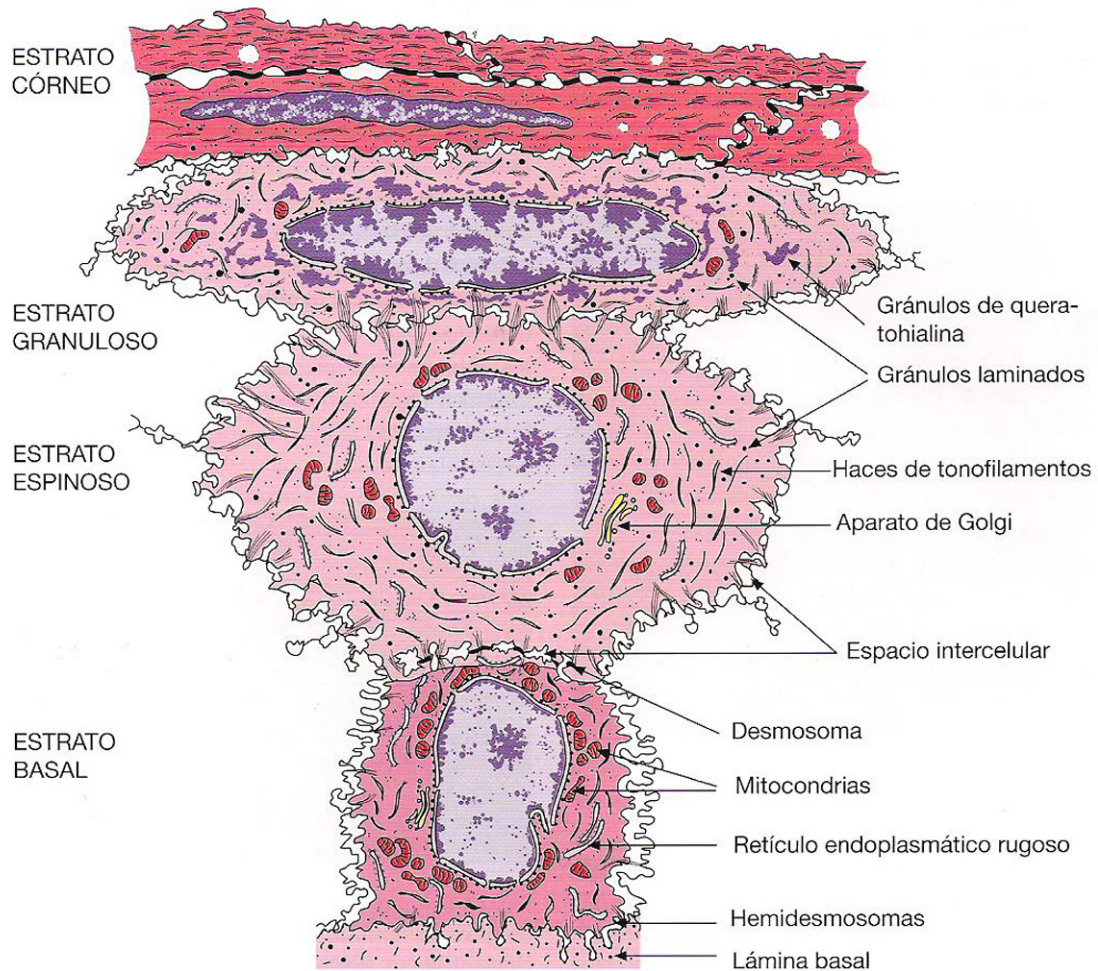
### **Estrato lúcido**

Este estrato, considerado por algunos histólogos como parte del estrato córneo, se encuentra únicamente en la piel gruesa. A microscopía óptica presenta un aspecto refráctil, con células eosinófilas en las que la queratinización se encuentra en un estado bastante avanzado. Estos queratinocitos son ricos en *eleidina*, una forma intermedia de la queratina de carácter acidófilo y fuertemente refractante.

### **Estrato córneo**

Las células de este estrato, el más superficial de la epidermis, son las que presentan el mayor grado de diferenciación. Aparecen en múltiples capas, con morfología aplanada y densamente empaquetadas. Estos queratinocitos han perdido el núcleo y los orgánulos citoplasmáticos, y se han llenado casi por completo de filamentos de queratina entrecruzados con filagrina. Esta interacción provoca el empaquetamiento de los filamentos en gruesos haces, lo que causa el aplanamiento característico del

estrato córneo. En la superficie tiene lugar finalmente la descamación de los queratinocitos.



**Figura 2:** Esquema de los estratos epidérmicos. Tomado de Brühl y cols. (2014).

### Células de la epidermis

El tipo celular predominante es el **queratinocito**. Se origina en el estrato basal, y a medida que comienza su migración y diferenciación, la célula va sintetizando **queratina**, que se ensamblará formando los *filamentos de queratina*, un tipo de filamentos intermedios llamados comúnmente *tonofilamentos*. En el estrato espinoso, los filamentos comienzan a agruparse en haces más gruesos denominados *tonofibrillas*, aumentando en el estrato granuloso por la interacción con la filagrina y la tricohialina, hasta convertirse en células cornificadas. Este proceso se conoce como

**queratinización**, y las fibrillas a las que da lugar son de **queratina blanda**, a diferencia de la queratina dura del pelo y las uñas. La queratinización va acompañada de la desintegración del núcleo y otros orgánulos, y el engrosamiento de la membrana plasmática, así como la formación de la **barrera epidérmica contra el agua**, compuesta por dos elementos. Por un lado, se organiza sobre la superficie interna de la membrana plasmática la *envoltura celular*, compuesta por complejos proteicos insolubles. En el exterior de la membrana celular se forma la *envoltura lipídica*, mediante la secreción de ceramidas y otros lípidos desde los cuerpos laminares.

Los **melanocitos** son células dendriformes situadas en el estrato basal, derivados de los melanoblastos que migran desde la cresta neural durante el desarrollo embrionario. Estas células emiten prolongaciones entre los queratinocitos del estrato espinoso, sin establecer con ellos uniones desmosómicas, y conservan la capacidad de replicarse durante toda su vida, aunque a un ritmo más lento que los queratinocitos. Los melanocitos producen y secretan el pigmento **melanina**, cuya principal función es proteger al organismo frente a los efectos deletéreos de la radiación ultravioleta no ionizante, y que a su vez es el principal responsable de la coloración cutánea. Este compuesto es transferido a los queratinocitos dentro de los melanosomas por *donación pigmentaria*, un proceso por el que el queratinocito fagocita el extremo de la prolongación melanocítica, siendo por tanto un ejemplo de *secreción citocrina*.

Las **células de Langerhans** o **células dendríticas** son células presentadoras de antígeno que se encuentran entre los queratinocitos de la epidermis sin establecer uniones desmosómicas con los mismos. Forman parte del sistema fagocítico mononuclear y están implicadas en las reacciones de hipersensibilidad retardada.

Por último, en el estrato basal se encuentran las **células de Merkel**, células epiteliales modificadas implicadas en la percepción sensorial cutánea. Aparecen asociadas a una estructura discoidal formada por una fibra nerviosa aferente que se desmieliniza y expande al atravesar la lámina basal, formando el conjunto un mecanorreceptor sensorial denominado *corpúsculo o disco de Merkel*.



Entre las capas epidérmica y dérmica se encuentra la **membrana basal**, una estructura con funciones tanto estructurales (adhesión celular, compartimentalización y armazón) como regulatorias (señalización y control del tráfico de sustancias). Está compuesta por colágeno (principalmente de tipo IV), laminina, entactina/nidógeno y proteoglicanos (especialmente perlecano), entre otros componentes (Kierszenbaum y Tres, 2012; Ross y Pawlina, 2012).

### 1.1.2 Dermis

#### Estructura

Bajo la membrana basal se encuentra la dermis, una gruesa capa de tejido conectivo presente entre la epidermis y el tejido subcutáneo. La unión dermo-epidérmica discurre siguiendo un contorno irregular (excepto en las zonas de piel más finas), formando las llamadas **papilas dérmicas**, evaginaciones del tejido conjuntivo que interdigitan con estructuras complementarias de la epidermis conocidas como **crestas epidérmicas**. De este modo, se consigue una mayor superficie de contacto entre ambas capas, mejorando las propiedades mecánicas en las zonas sometidas a mayor tensión, favoreciendo el intercambio de información y sustancias, y conformando nichos adecuados para alojar diferentes estructuras, como veremos más adelante. Las zonas de piel gruesa presentan además unas estructuras mayores que las papilas, denominadas **crestas dérmicas**, que dan lugar a la aparición de los surcos palmares y plantares característicos de cada individuo: los *dermatoglifos*.

Dentro de la dermis, se distinguen dos capas de estructura diferenciada: la dermis papilar y la dermis reticular.

#### **Dermis papilar**

Comprende la zona más superficial, compuesta por tejido conjuntivo laxo situado justo bajo la epidermis, incluyéndose en ella las papilas y las crestas dérmicas. Presenta una elevada cantidad de células, con una matriz laxa de haces no muy gruesos de colágeno, principalmente de tipos I (Col-I) y III (Col-III), y fibras elásticas delgadas. Contiene vasos



sanguíneos para el abastecimiento de la epidermis y terminaciones nerviosas sensoriales, ambos especialmente concentrados en las papilas dérmicas.

### **Dermis reticular**

Se extiende bajo la dermis papilar, y es un estrato mucho más denso, grueso y acelular que esta. Su matriz está formada por gruesos haces de colágeno, sobre todo tipo I, y fibras elásticas más fuertes, ambos orientados siguiendo las líneas de tensión de la piel (*líneas de Langer*).

### **Matriz extracelular**

En términos generales, la matriz extracelular se define como la porción extracelular de las estructuras multicelulares, y más específicamente, como la parte no celular presente en los diferentes tejidos animales. Esta matriz, más allá de servir de mero soporte físico, ejerce un papel activo y complejo en la regulación de las células relacionadas con ella, influyendo en su supervivencia, desarrollo, migración, proliferación, forma y función.

A diferencia de los epitelios, en los cuales la matriz es escasa y casi limitada a la membrana basal, en los tejidos conjuntivos la mayor parte de su volumen corresponde a la matriz extracelular, en la cual se encuentran embebidos los componentes celulares. La dermis no es una excepción, y en su mayor parte está formada por matriz, producida principalmente por los fibroblastos dérmicos. Las dos principales clases de macromoléculas que constituyen la matriz son las proteínas fibrosas (*matriz fibrilar*), como los colágenos y la elastina, y las que contienen cadenas de polisacáridos (*matriz amorfa o sustancia fundamental*), del tipo de los glicosaminoglicanos (GAG), proteoglicanos y otras glucoproteínas. A continuación se relacionan los componentes más relevantes de la matriz dérmica.

El **colágeno** es la principal proteína estructural de los tejidos conectivos animales. Como tal, es la proteína más abundante en los mamíferos, en los que constituye el 25% de la masa proteica total. Sus características más notables son su rigidez, su longitud y su estructura helicoidal trimérica filiforme, formada por tres cadenas  $\alpha$  polipeptídicas enrolladas en sentido levógiro. Esta proteína es especialmente rica en

residuos de glicina, que se encuentran cada tres aminoácidos y favorecen el empaquetamiento de las cadenas, siendo también importante la abundante presencia de prolina, la cual estabiliza la conformación helicoidal. Existen en el genoma humano 42 genes distintos codificantes para cadenas  $\alpha$ , las cuales se combinan formando las distintas clases de colágenos (unos 27 identificados hasta el momento, denotados mediante números romanos), siendo los más abundantes, con diferencia, los de tipo I. Los diferentes colágenos suelen englobarse en varias categorías, de acuerdo a su modelo de polimerización, siendo los siguientes los más importantes:

- Colágenos fibrilares, principales formadores de fibras, incluyen los tipos **I, II, III, V y XI**.
- Colágenos asociados a fibrillas (FACIT), siendo el más notable el tipo **IX**.
- Colágenos formadores de redes, entre los que se incluyen el tipo **IV** y el tipo **VII**.
- Colágenos transmembrana, como el tipo **XVII**.
- Proteínas centrales de proteoglicano, tipo **XVIII**.

La síntesis de las fibras de colágeno sigue un proceso complejo, que implica acontecimientos tanto intracelulares como extracelulares. En resumen, tras la traducción y translocación al lumen del retículo endoplasmático, las *procadenas*  $\alpha$  sufren una serie de modificaciones postraduccionales; se produce la hidroxilación de residuos de prolina y lisina (proceso para el cual es fundamental la vitamina C) y la glucosilación de otros residuos aminoacídicos. Tras ello, las procadenas  $\alpha$  trimerizan formando el *procolágeno*, que será secretado al espacio extracelular, donde se escinden enzimáticamente los extremos no helicoidales dando lugar a la molécula de *colágeno*. Estas moléculas se autoensamblarán formando las *fibrillas de colágeno*, las cuales se refuerzan por el establecimiento de enlaces covalentes entre los residuos de lisina, lo que se conoce como *entrecruzamiento* (“cross-linking”).

La **elastina** es una proteína muy hidrofóbica, que como el colágeno es rica en prolina y glicina, aunque carece de glucosilación, presenta muy poca hidroxiprolina y no presenta hidroxilisina. Esta proteína es sintetizada como *tropoelastina*, un precursor que se secreta y ensambla extracelularmente. La elastina forma un núcleo que se rodea de una red de microfibrillas, entre las que cabe destacar la *fibrilina-1*, formando

conjuntamente las **fibras elásticas**, que se organizan en un modelo ramificado tridimensional entremezcladas con el colágeno. Mientras que las fibras de colágeno son la principal fuerza de resistencia a la tracción, las fibras elásticas proveen al tejido de la elasticidad necesaria para recuperarse tras una deformación transitoria.

Rellenando los espacios entre las fibras y las células se encuentra la **sustancia fundamental**, un gel altamente hidratado que facilita la difusión de nutrientes, metabolitos y otros factores, influye en los procesos de migración, crecimiento y diferenciación celular, y proporciona al tejido resistencia a las fuerzas de compresión. Sus principales componentes son cadenas de polisacáridos del tipo de los **glicosaminoglicanos**, los cuales normalmente se hallan unidos a proteínas mediante enlaces covalentes formando **proteoglicanos**. Los GAG son polímeros no ramificados compuestos por repeticiones de disacáridos en los que uno de ellos es un aminoazúcar, y que en la mayoría de los casos se encuentra sulfatado. Debido a su elevada densidad de carga negativa, tienen gran capacidad para captar iones  $\text{Na}^+$ , lo que, por la actividad osmótica de este catión, provoca la acumulación de agua. Los principales tipos de GAG son el *ácido hialurónico*, el *condroitín sulfato*, el *heparán sulfato* y el *queratán sulfato*. Con excepción del ácido hialurónico, los demás GAG se encuentran unidos covalentemente a una proteína, formando los proteoglicanos, moléculas de gran diversidad que a su vez pueden formar asociaciones aún más complejas con el resto de componentes de la matriz (como el ácido hialurónico). Los proteoglicanos desempeñan un importante papel en los procesos de señalización química por su capacidad de unión a moléculas de señalización (factores de crecimiento proteicos), controlando de esta manera su difusión, disponibilidad y actividad, pudiendo incluso actuar como correceptores en el caso de los proteoglicanos de membrana. Entre los proteoglicanos más importantes se encuentran el *agrecano*, el *betaglicano*, la *decorina*, el *perlecano*, el *versicano* y el *sindecano*.

En la matriz extracelular también se encuentran varios tipos de **glucoproteínas multiadhesivas**, que poseen dominios de unión para componentes de la matriz, como colágenos y GAG, y para receptores de superficie celular (principalmente *integrinas*). De esta manera, facilitan la organización de la matriz, el anclaje celular y sirven como señales para la migración, proliferación y diferenciación de las células durante el

desarrollo y la reparación tisular. La más conocida de estas proteínas es la *fibronectina*, de gran importancia en las interacciones célula-matriz, siendo otros ejemplos la *laminina*, la *tenascina*, la *osteopontina* y la *entactina/nidógeno*.

Como se ha indicado anteriormente, la matriz extracelular es sintetizada por las células del tejido, especialmente por los fibroblastos. Sin embargo, esta matriz una vez sintetizada no es inmutable, sino que se trata de una **estructura dinámica**, capaz de permitir la división y migración de las células. Esta capacidad de modificación de la matriz es especialmente evidente durante procesos como la angiogénesis, la migración leucocitaria o la reparación tisular. Por tanto, las células tienen que ser capaces no solamente de sintetizar matriz, sino también de degradarla a nivel local. En general, los componentes de matriz son degradados por proteasas extracelulares, en su mayoría pertenecientes al grupo de las **metaloproteasas matriciales** o **MMP**, (dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ ), existiendo también **serin-proteasas**. La actividad de estos enzimas ha de estar regulado precisamente, para lo que existen tres mecanismos básicos:

- *Activación local*, normalmente por proteólisis de un precursor inactivo.
- *Confinamiento en la superficie celular*, uniendo la proteasa a un receptor de superficie.
- *Secreción de inhibidores*, como los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMP) o las serpinas (inhibidores de serin-proteasas).

### Células de la dermis

El tipo celular característico de la dermis es el **fibroblasto**. Estas células con morfología fusiforme y núcleo alargado son las encargadas de la síntesis de las fibras y la sustancia fundamental de la matriz. Otro tipo de células relacionadas con las anteriores son los **miofibroblastos**, de similar morfología pero con capacidad contráctil. Presentan en su citoplasma filamentos de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha\text{SMA}$ ) y tienen especial importancia en los procesos de cicatrización, como se discute más adelante.

En la dermis se pueden encontrar también **macrófagos (histiocitos)**, derivados de los monocitos circulantes. Son células con capacidad fagocítica y participan en la respuesta inmunitaria. Al encontrarse cuerpos extraños grandes, estas células pueden

fusionarse para formar un gran sincitio conocido como **célula gigante de cuerpo extraño** (FBGC) o, cuando los núcleos se ordenan en la periferia celular, **célula de Langhans**.

Los **mastocitos** o **células cebadas** son células grandes cuyo citoplasma está repleto de un gran número de gránulos muy basófilos que contienen heparina, histamina y serin-proteasas, entre otras sustancias. Tras ser estimuladas, estas células liberan el contenido de sus gránulos, así como otros mediadores lipídicos y proteicos (factores de crecimiento, prostaglandinas, leucotrienos, citoquinas, interleuquinas, etc.).

Además de estas células, se pueden encontrar **células madre mesenquimáticas**, vitales para la reparación tisular, **pericitos** asociados a capilares, **células musculares lisas** de los músculos erectores del pelo y **células del sistema inmune**, como linfocitos, plasmocitos y granulocitos (Alberts y cols., 2010; Eckes y cols., 2010; Kierszenbaum y Tres, 2012; Ross y Pawlina, 2012).

### 1.1.3 Hipodermis (tejido subcutáneo)

Bajo la dermis se encuentra una capa de tejido adiposo, llamado **panículo adiposo**, de espesor variable, cuyas principales funciones son el almacenamiento de energía y el aislamiento térmico. Esta capa, junto con el tejido conjuntivo laxo asociado forma la hipodermis o tejido subcutáneo. En muchos animales y en algunas zonas anatómicas del ser humano aparece bajo el panículo adiposo una delgada capa de músculo estriado, conocida como **panículo carnoso** (Kierszenbaum y Tres, 2012; Ross y Pawlina, 2012).

### 1.1.4 Vascularización, innervación y anexos cutáneos (faneras)

La **vascularización** cutánea, que cumple funciones tanto termorreguladoras como de abastecimiento, se organiza en tres plexos interconectados: *plexo subcutáneo*, *plexo cutáneo* y *plexo subpapilar*. De este último parten las asas de capilares de las papilas dérmicas, que permiten el abastecimiento por difusión de la epidermis avascular.

Asimismo, la piel es también rica en vías linfáticas, que junto con las redes venosas, permiten el drenaje de este órgano.

En la piel se encuentran diversos tipos de **receptores sensoriales**, entre los que se encuentran las *terminaciones libres*, los *discos de Merkel*, los *bulbos terminales de Krause*, los *corpúsculos de Pacini*, los *corpúsculos de Meissner* y los *corpúsculos de Ruffini*. Existen también **terminaciones nerviosas motoras** para los vasos sanguíneos, los músculos erectores del pelo y las glándulas sudoríparas.

Por último, asociados a la piel se encuentran los llamados **anexos cutáneos** o **faneras**, como son los *folículos pilosos y pelos*, las *glándulas sebáceas*, las *glándulas sudoríparas* y las *uñas* (Kierszenbaum y Tres, 2012; Ross y Pawlina, 2012).

### 1.1.5 Funciones de la piel

La piel constituye la principal interfaz entre el organismo y el medio exterior, proporcionando por un lado protección y aislamiento, mientras que a la vez permite la existencia y regulación de un flujo de materia, energía e información a su través. Debido a ello, las funciones de la piel son múltiples y variadas. En primer lugar, este órgano constituye una **barrera** protectora frente al exterior, protegiendo contra agentes físicos, químicos y biológicos como son el estrés mecánico, la radiación ultravioleta, los compuestos tóxicos y los microorganismos patógenos, entre otros. Se encarga de regular la **temperatura corporal**, conservando o disipando el calor según las necesidades del organismo, y controla la **pérdida de agua** corporal, siendo por tanto un elemento clave en la **homeostasis**. También participa en la **excreción** a través de sus secreciones glandulares, es capaz de almacenar grasa como **reserva energética** y desempeña funciones **endocrinas** (síntesis de mediadores y de vitamina D). Asimismo, la piel es un **órgano sensorial**, capaz de recibir y transmitir estímulos del medio externo de diversa naturaleza (estímulos mecánicos, temperatura, dolor). Además, al ser la parte más externa y por lo tanto expuesta y visible del organismo, tiene una gran influencia en la **interacción social** del individuo a múltiples niveles, como pueden ser la señalización sexual, indicaciones sobre el estado anímico e

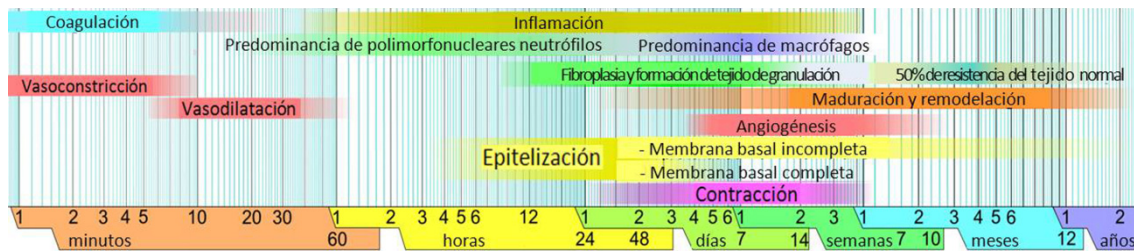
información sobre el estado de salud del individuo, cobrando este último especial relevancia en el ámbito médico (Kierszenbaum y Tres, 2012; Ross y Pawlina, 2012).

La piel es, por tanto, un órgano complejo de vital importancia para los seres vivos, y muy especialmente para el ser humano. Constituye nuestra frontera como organismo y como individuo, siendo capaz de ser tanto una barrera aislante y protectora como un elemento de intercambio y comunicación con el medio exterior.

## 1.2 CICATRIZACIÓN CUTÁNEA

Tras sufrir una lesión, en prácticamente todos los tejidos se desencadena una serie de procesos reparativos de naturaleza similar (Gurtner y cols., 2008). En el caso de la piel, inmediatamente después de sufrir un daño se ponen en marcha mecanismos de cicatrización, los cuales pueden durar años, cuya finalidad primordial es restaurar la barrera cutánea. Estos mecanismos provocan la curación de la herida por fibrosis y formación de cicatriz (Reinke y Sorg, 2012).

El **proceso de cicatrización** comprende una serie compleja y dinámica de procesos, en los que se encuentran implicados mediadores solubles, células sanguíneas, matriz extracelular y células del parénquima. Clásicamente, estos procesos se engloban dentro de tres fases principales que se solapan en el tiempo: **fase inflamatoria, fase proliferativa o de formación tisular y fase de maduración o remodelación tisular**. Dentro de la reparación cutánea, especialmente en el caso de lesiones que comprenden el grosor total de la piel, tienen gran relevancia los procesos de infiltración leucocitaria, formación de tejido de granulación, fenómenos de contracción, síntesis de nueva matriz y reepitelización (Martin, 1997; Singer y Clark, 1999; Williamson y Harding, 2004; Enoch y Leaper, 2005; Lobmann y cols., 2005; Broughton y cols., 2006; Li y cols., 2007; Acosta y cols., 2008; Barrientos y cols., 2008; Gurtner y cols., 2008; Menke y cols., 2008; Eckes y cols., 2010; Mahdavian Delavary y cols., 2011; Schultz y cols., 2011; Bellavia y cols., 2014; Haertel y cols., 2014) (**Figura 3**).



**Figura 3:** Esquema de los principales procesos que intervienen en la cicatrización cutánea y su evolución a lo largo del tiempo. Modificado a partir de Häggström (2014).

### Fase inflamatoria

Inmediatamente tras la lesión cutánea, se activa la cascada de coagulación para la formación de una costra (hemostasia). Las plaquetas y los leucocitos polimorfonucleares presentes liberan una batería de mediadores proinflamatorios, favoreciendo el reclutamiento de un gran número de neutrófilos. A medida que avanza el tiempo, estas células son paulatinamente sustituidas por macrófagos, los cuales predominarán en la inflamación tardía. Durante esta fase, se forma una matriz provisional de fibrina, y las células inflamatorias se encargan de la eliminación de bacterias y desbridamiento de la herida (Broughton y cols., 2006; Li y cols., 2007; Eming y cols., 2007a; Gurtner y cols., 2008; Lucas y cols., 2010; Wicks y cols., 2010).

### Fase proliferativa

Al cabo de unos días, la zona de la herida entra en un estado proliferativo, en el cual los principales objetivos del proceso reparativo son cubrir la superficie de la herida, formar un tejido de granulación y restaurar la red vascular. Esta formación de nuevo tejido es propiciada por la migración y proliferación de fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales y queratinocitos, así como por el reclutamiento de precursores circulantes. Durante esta fase tienen lugar los procesos de angiogénesis, epitelización y síntesis de nueva matriz extracelular sustituyendo a la provisional de fibrina, así como la resolución de la inflamación. Esto dará como resultado un tejido de granulación y una posterior solución de continuidad, donde también participan los fenómenos de contracción tisular (Opalenik y Davidson, 2005; Li y cols., 2007; Wu y cols., 2007a; Gills y Parks, 2008; Gurtner y cols., 2008; Reinke y Sorg, 2012; Wicks y cols., 2014).



### Fase de maduración y remodelación

Finalmente, tras unas semanas, comienzan a producirse fenómenos de remodelación en el nuevo tejido, cuya actividad se mantendrá durante meses o incluso años. Los procesos anteriormente desencadenados comienzan a remitir, produciéndose una reducción de la actividad metabólica y la celularidad en el tejido de granulación mediante apoptosis. Se produce una retracción de la vasculatura y un descenso en el número de fibroblastos y miofibroblastos, así como de células infiltradas. La matriz abundante en colágeno III va siendo gradualmente sustituida mediante la acción de las MMPs y síntesis de colágeno tipo I, a la vez que continúan los fenómenos de contracción y reorganización de las fibras (Desmoulière y cols., 1995; Greengalgh, 1998; Broughton y cols., 2006; Gill y Parks, 2008; Gurtner y cols., 2008; Bao y cols., 2009; Reinke y Sorg, 2012).

Tras la **reparación** de una lesión, lo que previamente era un tejido plenamente funcional se convierte en un “parche” de células, principalmente fibroblastos, y matriz desorganizada predominantemente colágena (Gurtner y cols., 2008). El tejido cicatrizal formado no alcanza la resistencia mecánica inicial, cuyos valores máximos se sitúan en torno a un 70-80% (Broughton y cols., 2006; Corr y Hart, 2013). Asimismo, esta reparación conlleva un cierto grado de pérdida de funcionalidad, debido a la ausencia en el tejido cicatrizal de anexos y estructuras cutáneas que no son restablecidas (Reinke y Sorg, 2012).

Aunque en algunos organismos eucariotas puede producirse una completa **regeneración** tisular, en los mamíferos esta facultad tan solamente está presente durante el desarrollo fetal o limitada a algunos órganos como el hígado (Bayat y cols., 2003; Gurtner y cols., 2008; Wulff y cols., 2012; Hu y cols., 2014). La curación sin cicatrización observada en el tejido fetal parece deberse a diferencias en la matriz extracelular, en la respuesta inflamatoria, en los mediadores celulares, en la expresión génica y en la función de las células troncales (Reinke y Sorg, 2012; Wulff y cols., 2012; Hu y cols., 2014; King y cols., 2014).

Esta limitación regenerativa parece causada, al menos en parte, por la reparación fibrótica que tiene lugar de manera mucho más veloz. Estos procesos reparativos,

aunque dan lugar a un tejido de limitada funcionalidad, probablemente fueron seleccionados durante la evolución al representar una ventaja de supervivencia más inmediata, al limitar factores como la infección y la posibilidad de sufrir un mayor daño, propiciando también una recuperación más rápida, aunque con un resultado de menor calidad (Bayat y cols., 2003; Eming y cols, 2007a; Gurtner y cols., 2008).

### 1.2.1 Hemostasia y coagulación

Inmediatamente tras la lesión, la hemorragia dispara la cascada de **coagulación**, tanto la vía intrínseca como la extrínseca. El contacto de la sangre con el colágeno provoca la activación de las **plaquetas**, las cuales comienzan a agregarse y liberan el contenido de sus gránulos. Para restablecer la **hemostasia** e impedir una mayor pérdida de sangre, los vasos dañados se constriñen durante los primeros minutos, permitiendo la formación del coágulo. Este, más allá de su mera función protectora, constituirá una matriz provisional sobre la que puedan migrar las células, estando compuesto por fibrina entrecruzada y proteínas de la matriz, tales como fibronectina, vitronectina y trombospondina, y conformará un reservorio de factores de crecimiento. Tras la vasoconstricción se produce la **vasodilatación**, propiciado por la histamina y otros mediadores vasoactivos, aumentando el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular, y favoreciendo la posterior migración de los leucocitos. Los trombocitos, además de formar el coágulo, secretan diversos mediadores, factores de crecimiento y citoquinas, los cuales, junto con los factores producidos por la propia cascada de coagulación, reclutan a las células inflamatorias y ponen en marcha los mecanismos de reparación tisular (Singer y Clark, 1999; Werner y Grose, 2003; Williamson y Harding, 2004; Barrientos y cols., 2008; Reinke y Sorg, 2012).

### 1.2.2 Inflamación

La liberación de citoquinas vasoactivas en la zona de la herida (como prostaglandinas e histamina) favorece el riego y la permeabilidad vascular, lo que permite la migración de los leucocitos y causa edema local (Li y cols., 2007; Beldon, 2010).

Durante los primeros estadios, las células inflamatorias predominantes son los **neutrófilos**. Estos leucocitos se infiltran en el área dañada en respuesta a los factores quimiotácticos secretados y productos bacterianos presentes, y comienzan a limpiar la zona mediante la fagocitosis de partículas extrañas, restos de tejido y bacterias, además de secretar quimioatrayentes para otras células inflamatorias. Estos leucocitos permanecen en la zona de la herida entre 2 y 5 días, en condiciones normales, y liberan mediadores proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y las interleuquinas (IL) 1 $\beta$ , 6 y 8, así como sustancias antimicrobianas, incluyendo especies reactivas del oxígeno (ROS), y proteasas, siendo además capaces de modificar el fenotipo de los macrófagos. Finalmente, los neutrófilos desaparecen por apoptosis, son extruidos con la costra o fagocitados por los macrófagos (Singer y Clark, 1999; Williamson y Harding, 2004; Daley y cols., 2005; Eming y cols., 2007a; Schäfer y Werner, 2008a; Koh y DiPietro, 2011; Reinke y Sorg, 2012).

Los monocitos circulantes son atraídos a la zona dañada por la acción de sustancias quimiotácticas, como los fragmentos de proteínas de la matriz, el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), donde se convierten en **macrófagos** activados. Estas células, que sustituyen a los neutrófilos como células inflamatorias predominantes, favorecen la formación del tejido de granulación y llevan a cabo la fagocitosis de microorganismos, neutrófilos y restos de matriz. La adherencia a la matriz de estas células induce la producción de diversos factores de crecimiento y citoquinas, y su actividad es crucial para la resolución de la inflamación y el soporte bioquímico de la proliferación celular y síntesis de matriz durante la reparación tisular. En los últimos años, ha cobrado especial importancia el estudio de los distintos **fenotipos de los macrófagos** durante los procesos de reparación tisular. Actualmente se sostiene que durante las primeras etapas estas células mantienen un perfil proinflamatorio (fenotipo de activación clásica o M1), cambiando más adelante hacia un estado prorregenerativo (fenotipo de activación alternativa o M2). (Singer y Clark, 1999; Gordon, 2003; Eming y cols., 2007a; Varin y Gordon, 2009; Stout, 2010; Koh y DiPietro, 2011; Ferrante y Leibovich, 2012; Reinke y Sorg, 2012; Mantovani y cols., 2013; Wicks y cols., 2014).

Otro tipo celular importante implicado en la respuesta inflamatoria es el **mastocito**. Estas células, habitualmente presentes en la dermis y especialmente en las cercanías de las terminaciones nerviosas y los vasos sanguíneos, son activadas por el daño tisular. Esto provoca la liberación por su parte de una batería de mediadores (factores de crecimiento, citoquinas, interleuquinas, proteasas, GAGs, histamina, mediadores lipídicos, etc.), aumentando su número en los bordes de la lesión hasta 5 veces. Los mastocitos desempeñan un importante papel en la disolución del coágulo, gracias a la acción de mediadores como heparina, triptasa, quimasa y activador del plasminógeno tisular, y participan de forma activa en el reclutamiento de leucocitos, por medio de la liberación de leucotrienos, proteasas y citoquinas, especialmente IL-8. Asimismo, son capaces de incrementar la actividad fagocítica de los macrófagos, e incluso actuar ellos mismos como fagocitos, y provocan una reducción del umbral nociceptivo debido a la liberación de factor de crecimiento nervioso (NGF), provocando la hiperalgesia característica de las zonas inflamadas. Durante el proceso cicatrizal, se han descrito implicaciones de estas células en todas las fases de la cicatrización cutánea (Noli y Miolo, 2001; Martin y Leibovich, 2005; Eming y cols., 2007a; Ng 2010; Weller y cols., 2011; Oskeritzian 2012).

Aunque algunos estudios muestran que la cicatrización puede ocurrir con ausencia de inflamación (Martin y cols., 2003), esta respuesta inflamatoria es vital en el proceso reparativo, ya que se encarga de la protección frente a infecciones y desbridamiento (Dovi y cols., 2004; Menke y cols., 2007), y proporciona parte de los factores de crecimiento y citoquinas necesarias para su progresión (Eming y cols., 2007a). Sin embargo, debe ser un proceso controlado, ya que el nivel de inflamación parece determinar el grado de formación de cicatriz, y una actividad sostenida puede conducir a una cronificación de la herida (Menke y cols., 2007; Reinke y Sorg, 2012).

### 1.2.3 Epitelización

La reepitelización comienza a las pocas horas de la lesión. Las células de los bordes y de los anexos cutáneos, como los folículos pilosos, disuelven sus uniones desmosómicas y hemidesmosómicas y reorganizan sus tonofilamentos lo que, junto a

la acción de las proteasas (MMPs, activadores del plasminógeno) y la expresión de receptores tipo integrina, les permite migrar y diseccionar el área de la herida, separando el tejido viable de la costra. Al cabo de uno o dos días, las células de los bordes comienzan a proliferar, mientras continúa la migración y se secreta una nueva membrana basal, hasta que finalmente se consigue el cierre total. El patrón de reepitelización dependerá de la profundidad de la lesión; en aquellas en las que se mantengan anexos sucederá en forma de parches o islotes, mientras que si la lesión ha destruido todos los anexos cutáneos la epitelización partirá de los bordes siguiendo un patrón centrípeto. Una vez que los queratinocitos se encuentran firmemente sujetos a la membrana basal y a la dermis, vuelven a adquirir su fenotipo normal diferenciado. De esta manera la epidermis, tras haber sufrido un engrosamiento inicial, vuelve a adquirir su espesor normal y se produce la restauración de la barrera epidérmica. En la regulación de este proceso de reepitelización influyen múltiples factores (uniones intercelulares y célula-matriz, factores de crecimiento, proteasas y factores ambientales, entre otros), y para su correcta ejecución debe coordinarse con el resto de los procesos, a la vez que toma parte activa siendo fuente de diversas citoquinas y factores de crecimiento (Madlener y cols, 1998; Singer y Clark, 1999; Williamson y Harding, 2004; Morasso y Tomic-Canic, 2005; Santoro y Gaudino, 2005; Li y cols., 2007; Sivamani y cols., 2007; Schäfer y Werner, 2008a; Reinke y Sorg, 2012; Martins-Green, 2013).

#### 1.2.4 Formación de tejido de granulación

Aproximadamente a los cuatro días de la lesión el tejido de granulación comienza a formarse. Los factores liberados por los macrófagos atraen y estimulan a los fibroblastos del tejido conectivo colindante y la adventicia perivascular, los cuales migran a la zona lesionada, a lo que se suma el reclutamiento de células precursoras circulantes. Una vez allí, comienzan a secretar una **matriz** provisional rica en fibrina, fibronectina y ácido hialurónico, que será gradualmente reemplazada por una matriz de colágeno. Este tejido recibe su nombre debido a la alta densidad de fibroblastos, granulocitos, macrófagos, capilares y haces laxos de colágeno, que le confiere un aspecto granuloso. Durante esta fase, los fibroblastos sufren una diferenciación hacia

miofibroblastos, los cuales son los principales productores de nueva matriz extracelular, y finalmente tras la reparación de la lesión reducen su número por apoptosis (Singer y Clark, 1999; Greengalgh, 1998; Midwood y cols, 2004; Williamson y Harding, 2004; Opalenik y Davidson, 2005; Wu y cols., 2007a; Eckes y cols., 2010; Reinke y Sorg, 2012; Klingberg y cols., 2013).

### 1.2.5 Neovascularización

Con el fin de poder abastecer al tejido de granulación es necesaria la formación de nuevos vasos sanguíneos. Para que se desarrolle una correcta **angiogénesis** se necesitan diversos factores de crecimiento, entre los que destacan el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2), así como una matriz adecuada y actividad proteasa que permitan el crecimiento de los nuevos vasos. La unión de los factores a los receptores de las células endoteliales provoca la liberación de proteasas y el comienzo de la proliferación y migración de las mismas ("*sprouting*"). Más tarde comienzan a formar canales tubulares que finalmente se diferenciarán y madurarán, reclutando pericitos y células musculares lisas, hasta restablecer el flujo sanguíneo. Durante la maduración del tejido neoformado, estos vasos desaparecerán paulatinamente, dando lugar a una cicatriz relativamente avascular (Singer y Clark, 1999; Williamson y Harding, 2004; Eming y Hubbell, 2011; Reinke y Sorg, 2012).

### 1.2.6 Contracción y reorganización de la matriz extracelular

Unos días después de la lesión, hacen su aparición en el tejido de granulación los **miofibroblastos**. Estas células proceden principalmente de la diferenciación de fibroblastos, aunque se han descrito procedencias de otros tipos celulares, y su inducción se encuentra relacionada con la existencia de factores fibrogénicos, especialmente el TGF- $\beta$ 1, y mecánicos (Hinz y cols., 2001; Hinz y cols., 2007; Werner y cols., 2007; Finnson y cols., 2013). La aparición de estas células con capacidad contráctil se corresponde con el comienzo de la compactación del tejido neoformado y **contracción** de la herida, a lo que también contribuyen las fuerzas de tracción y

engrosamiento de las fibras de colágeno, resultando en una aproximación de los bordes (Singer y Clark, 1999; Desmoulière y cols., 2005; Hinz, 2010; Ehrlich y Hunt, 2012).

El **colágeno** depositado continúa sufriendo **remodelación** durante meses, en un proceso dependiente de su síntesis y catabolismo. El colágeno III secretado durante la fase proliferativa es reemplazado gradualmente por colágeno I. Su degradación está controlada por las MMPs y su equilibrio con sus inhibidores, los TIMPs. A medida que la herida madura, se producen haces de colágeno mayores y más entrecruzados, lo que aumenta su resistencia. Sin embargo, la tensión de rotura máxima que se puede alcanzar tras cicatrizar una herida siempre será menor que la de la piel no dañada, en torno a un 70-80%. (Singer y Clark, 1999; Midwood y cols, 2004; Williamson y Harding, 2004; Gill y Parks, 2008).

### 1.3 ALTERACIONES DEL PROCESO DE CICATRIZACIÓN: CICATRIZACIÓN COMPROMETIDA

Como se ha expuesto anteriormente, la cicatrización es un fenómeno complejo que comprende múltiples procesos, involucra a diversos tipos celulares y ha de ocurrir siguiendo unos determinados, aunque flexibles, patrones espacio-temporales. Debido a esta complejidad, las posibilidades de que ocurra alguna disfunción del sistema que comprometa la normal reparación son sin duda elevadas. Aunque durante la evolución de estos mecanismos ha surgido un cierto nivel de redundancia capaz de compensar algunos de los problemas y deficiencias que puedan plantearse (Bayat y cols., 2003; Gurtner y cols., 2008; Reinke y Sorg, 2012), la existencia de alteraciones que pueden afectar al fenómeno de la cicatrización es ciertamente importante, y posee una enorme relevancia clínica. Se calcula que hasta uno de cada cien individuos mayores de 45 años sufre alguna herida de difícil curación (Williamson y Harding, 2004), provocando ingentes costes sanitarios y sociales.

El proceso de reparación, el cual por sí mismo resulta ya comprometedor para el organismo, puede a su vez verse afectado por diversos **factores** que de alguna manera

obstaculicen el normal desarrollo y resolución de la cicatrización. Algunos de los más comunes y relevantes en la práctica clínica son una excesiva hipoxia de la herida, infección, presencia de residuos y/o tejido necrosado, algunos medicamentos y drogas, carencias nutricionales, obesidad, edad, existencia de tumores, diversos factores ambientales y desórdenes metabólicos como en el caso de la diabetes, en el que profundizaremos más adelante (Stadelmann y cols., 1998; Burns y cols., 2003; Mustoe y cols., 2006; Boateng y cols., 2008; Menke y cols., 2008; Guo y DiPietro, 2010).

### 1.3.1 Desórdenes de la cicatrización

Para que se produzca un correcto proceso reparativo, los eventos tisulares y celulares que lo componen han de sucederse de manera coordinada y equilibrada, de forma que se produzca una transición gradual y continua desde el escenario de la herida recién sufrida hasta la formación de un tejido reparado maduro y estable. Cuando la respuesta reparativa tiene éxito y la herida no resulta en la muerte del organismo, los procesos desencadenados deben ir revirtiendo y atenuándose en una secuencia precisa (Gurtner y cols., 2008). Cuando estos patrones se ven alterados, tanto por falta de progresión como de reversión, se produce el **fallo en la cicatrización**.

La mayoría de **heridas comprometidas** no consiguen progresar de manera correcta a través de las fases normales de la cicatrización, sufriendo una inflamación exacerbada. Esto puede dar lugar a anomalías en la cicatrización, bien por exceso, como en el caso de la reparación anormal en queloides y cicatrices hipertróficas, bien por defecto, produciéndose retraso, estancamiento y ulceración (Eming y cols., 2007a; Gurtner y cols., 2008; Menke y cols., 2008; Reinke y Sorg, 2012).

Los **queloides** y las **cicatrices hipertróficas** son los ejemplos más conocidos de desórdenes fibroproliferativos, en los que se han descrito anomalías en migración y proliferación celular, inflamación, síntesis y remodelado de matriz, así como actividad excesiva de citoquinas fibrogénicas (Singer y Clark, 1999; Bayat y cols., 2003; Desmoulière y cols, 2005; Wynn, 2008; Finnson y cols., 2013). La aparición de este tipo de “cicatrización excesiva” parece estar relacionado, al menos en parte, con la existencia de estrés mecánico durante la reparación (Hinz y cols., 2001; Ogawa, 2011),



por lo que es más frecuente en regiones anatómicas de mayor movilidad, y en su desarrollo tiene especial importancia la población de miofibroblastos y una alta presencia de TGF- $\beta$ 1 (Bayat y cols., 2003; Desmoulière y cols., 2005; Hinz y cols., 2007; Sarrazy y cols., 2011; Finnson y cols., 2013) junto con un aumento en el número de mastocitos (Oskeritzian 2012; Wulff y Wilgus, 2013), observándose también niveles elevados de colágeno tipo III en el tejido cicatrizal (Téot y cols., 2011).

De manera contraria, aquellas heridas que no consiguen progresar de forma adecuada a través de las fases de la cicatrización normal y permanecen en un estado de inflamación patológica se conocen como **heridas crónicas** (Menke y cols., 2007; Bao y cols., 2008). Este tipo de heridas representan un grave problema sanitario, con un coste estimado que asciende a más de 3000 millones de dólares anuales solo en Estados Unidos, y cuyo coste social y psicológico, pese a no poder ser fácilmente cuantificado, resulta a todas luces inmenso al disminuir drásticamente la calidad de vida de los pacientes y su entorno cercano debido a la propia patología y a sus complicaciones más habituales, incluyendo amputaciones e incapacidades (Menke y cols., 2007; Sen y cols., 2009). Asimismo, se ha descrito una mayor incidencia en el desarrollo de tumores en este tipo de lesiones (Eming y cols., 2007a; Schäfer y Werner, 2008b). Las causas de las heridas crónicas pueden ser múltiples, pero la mayoría de las úlceras (en torno a un 90%) son causadas por isquemia secundaria a estasis venosa, presión o diabetes mellitus (Singer y Clark, 1999; Mustoe y cols., 2006; Eming y cols., 2007a; Menke y cols., 2007; Bao y cols., 2008).

### Inflamación crónica

En la cicatrización normal, el proceso inflamatorio es necesario para una correcta progresión. Además de propiciar un entorno adecuado para la curación al eliminar residuos y contaminantes, se encarga de poner en marcha y orquestar la posterior respuesta proliferativa. Para poder cumplir estas funciones, ha de ser un proceso controlado y autolimitante (Menke y cols., 2007; Reinke y Sorg, 2012), ya que sus efectos pueden ser perjudiciales y causar un mayor daño tisular si escapan a esta limitación temporal.

En una herida crónica, los neutrófilos, que en condiciones normales desaparecen de la zona en torno al tercer o cuarto día tras la lesión, permanecen en gran número y con elevada actividad. Debido a esto, los mecanismos que propiciaban la limpieza y desbridamiento iniciales de la herida acaban actuando sobre el tejido sano, provocando la degradación de la matriz. Se producen cantidades excesivas de proteasas (MMPs), especialmente MMP-8 y elastasa de neutrófilo, y se rompe el equilibrio entre estas y sus inhibidores, los TIMPs. Esto, unido a un descenso del pH local, conforma un **ambiente proteolítico**, el cual afecta no solo a la matriz, sino también a otros mediadores proteicos, como citoquinas y factores de crecimiento, cuya crucial actividad en la cicatrización se ve de esta manera comprometida (Stadelman y cols., 1998; Parks, 1999; Vaalamo y cols., 1999; Lauer y cols., 2000; Falanga, 2004; Eming y cols., 2007a; Barrientos y cols., 2008; Menke y cols., 2008; Eming y cols., 2010; Ariel y Timor, 2013). Esto, unido a la continua producción de **mediadores proinflamatorios**, da lugar a que las heridas crónicas presenten un perfil característico de citoquinas y factores de crecimiento, como veremos más adelante. Al descontrolarse la respuesta inflamatoria, la retroalimentación negativa que la limita deja de ser efectiva, y se entra en una retroalimentación positiva, provocando una inflamación sostenida, que retrasa o incluso impide que la herida progrese hacia la cicatrización (Menke y cols., 2007).

### Estrés oxidativo

Como consecuencia directa de una inflamación elevada y sostenida, las heridas crónicas se encuentran sometidas a un alto nivel de estrés oxidativo, principalmente debido a la presencia excesiva de **especies reactivas del oxígeno**. Las células inflamatorias, principalmente los neutrófilos, secretan grandes cantidades de estas ROS, en un proceso conocido como estallido respiratorio ("*respiratory burst*"). La actividad de estos potentes oxidantes es necesaria para defender al organismo frente al ataque de patógenos. Además, se ha comprobado que pequeñas cantidades son también importantes para la reepitelización y para la señalización durante la cicatrización, especialmente en el proceso de la angiogénesis. Sin embargo, un exceso de ROS resulta perjudicial debido a su gran reactividad, siendo capaces de producir peroxidación lipídica, y modificaciones de proteínas y ácidos nucleicos (Schäfer y

Werner, 2008a; Sen y Roy, 2008). Cuando su producción es excesiva o los mecanismos para su detoxificación son insuficientes, se produce un estrés oxidativo que provoca daño tisular, entrando en un ciclo de retroalimentación positiva, en el que se induce la expresión de citoquinas prooxidativas y se recluta un mayor número de neutrófilos. Estas situaciones han sido identificadas como una característica habitual en la patogénesis de heridas crónicas (Eming y cols., 2007a; Menke y cols., 2008; Schäfer y Werner, 2008a).

### Hipoxia tisular

Durante la formación del tejido de granulación, la baja concentración de oxígeno supone un estímulo para la angiogénesis (Stadelman y cols., 1998; Falanga, 2005; Bao y cols., 2008), de manera que el nuevo tejido reciba un suficiente aporte para su normal desarrollo. Esta demanda puede verse aumentada por factores como la infección de la herida, pues para combatirla se requiere oxígeno adicional para llevar a cabo el estallido respiratorio de los leucocitos (Sen y Roy, 2008), y, a la vez, puede ver comprometido su abastecimiento debido a un déficit en la angiogénesis y a la presencia de isquemia (Falanga, 2004), desembocando en un estado de hipoxia tisular. Este estado de baja oxigenación puede resultar perjudicial para la cicatrización, ya que limita la desinfección, ralentiza la formación de nuevo tejido e interfiere en los mecanismos normales de señalización (Stadelman y cols., 1998; Falanga, 2005; Schäfer y Werner, 2008a; Sen y Roy, 2008). Adicionalmente, la restauración de la circulación puede provocar un aumento de la inflamación y el estrés oxidativo, lo cual cobra gran importancia en las heridas sometidas a ciclos de isquemia y reperfusión, como las úlceras por presión (Mustoe y cols., 2006).

### **1.3.2 Diabetes y cicatrización: úlceras asociadas a diabetes**

Según la Organización Mundial de la Salud, la **diabetes mellitus** es un desorden metabólico de etiología múltiple, caracterizado por hiperglicemia crónica con alteraciones del metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas como resultado de defectos en la secreción de insulina. Existen dos tipos principales de diabetes: tipo I y tipo II. La **diabetes de tipo I** se caracteriza por una deficiencia en la secreción de

insulina por parte del páncreas, a menudo debido a una destrucción autoinmune de las células  $\beta$ . Se desarrolla normalmente durante la infancia o adolescencia, y requiere de tratamiento mediante administración de insulina a lo largo de toda la vida. La **diabetes de tipo II** se caracteriza por hiperglicemia debida a defectos en la secreción de insulina, acompañados normalmente por resistencia a esta hormona. Su aparición suele darse en pacientes de edad adulta, asociada a obesidad, falta de actividad física y alimentación inadecuada, y su tratamiento consiste en el control de la glucosa a través de distintos medios (actividad física, dieta, medicación oral y/o insulina). Adicionalmente, existe un tercer tipo, la **diabetes gestacional**, que se desarrolla durante el embarazo y en cuya aparición parecen estar implicadas interacciones hormonales.

La incidencia global de la **diabetes** se encuentra por encima de los 347 millones, y sigue incrementándose rápidamente (Falanga, 2004; Wicks y cols., 2014), ocasionando enormes gastos sanitarios, los cuales superan los 263000 millones de dólares en Estados Unidos y los 147000 millones de dólares en Europa. Actualmente, esto representa aproximadamente el 10% de sus respectivos presupuestos sanitarios, y se prevé que aumente hasta el 17% para 2035/36 (Hex y cols., 2012). La hiperglicemia asociada a los dos tipos de diabetes existentes (tipo I y tipo II) causa una gran variedad de complicaciones por todo el organismo, entre las que se encuentran retinopatías, enfermedades cardiovasculares, nefropatías y neuropatías. Tanto las patologías vasculares como las neuropatías contribuyen a la formación de **úlceras diabéticas**, asociadas a una inflamación desregulada (Wetzler y cols., 2000; Barrientos y cols., 2008; Wicks y cols., 2014). Se estima que un 15% de los pacientes desarrollan una úlcera de pie de diabético, la cual precede al 84% de las amputaciones de miembros inferiores relacionadas con la diabetes (Brem y Tomic-Canic, 2007).

La formación de **productos de glicación avanzada** (AGEs) debida a la alta concentración de glucosa en sangre en los pacientes diabéticos es la principal causa de las dificultades que este tipo de lesiones presentan en su cicatrización, siendo capaz de comprometer la práctica totalidad de los eventos necesarios para una correcta reparación cutánea (Brownlee, 2001; Berlanga y cols., 2005; Brownlee, 2005; Acosta y cols., 2008; Berlanga-Acosta y cols., 2010).

Debido a la hiperglucemia, las proteínas son susceptibles de sufrir procesos de **glicación inespecífica**, mediante la formación de bases de Schiff que se reorganizan formando productos de Amadori, dando finalmente lugar a AGEs. Estas modificaciones son capaces de causar alteraciones en las funciones enzimáticas, unión a ligandos, inmunogenicidad y vida media de las proteínas glicadas y/o entrecruzadas, habiéndose también descrito alteraciones en otros tipos moleculares, como lípidos o ácidos nucleicos (Singh y cols., 2001; Ahmed, 2005; Goldin y cols., 2006; Brouwers y cols., 2011).

La interacción de estos productos con el **receptor de AGEs** (RAGE), expresado en la mayoría de los tipos celulares implicados en la reparación cutánea, provoca un aumento del estrés oxidativo y de expresión de genes proinflamatorios, junto con una retroalimentación positiva de la expresión del propio receptor. A esto se suman las alteraciones funcionales causadas por la glicación de los componentes de la maquinaria de cicatrización, como factores de crecimiento y matriz extracelular (Duraismy y cols., 2001; Singh y cols., 2001; Goldin y cols., 2006; Peppia y cols., 2009).

Han sido ampliamente descritas en la bibliografía alteraciones en el proceso inflamatorio, que en este tipo de lesiones es frecuentemente incapaz de remitir. El elevado número de neutrófilos y macrófagos, así como las alteraciones en su polarización, termina provocando daños tisulares y fallos en la cicatrización (Wetzler y cols., 2000; Komesu y cols., 2004; Eming y cols., 2007a; Wicks y cols., 2014). Asimismo, la formación de un correcto tejido de granulación y su posterior maduración se ven comprometidas, mostrando alteraciones en la mayoría (si no en todos) los procesos necesarios. Entre ellas se incluyen carencias en la proliferación y quimiotaxis de fibroblastos y células vasculares (Hehenberger y cols., 1998; Loots y cols., 1999; Okano y cols., 2002; Lerman y cols., 2003), reducción en el reclutamiento de células progenitoras circulantes (Gallagher y cols., 2007), apoptosis reducida para la resolución de la fase proliferativa (Brown y cols., 1997; Al-Mashat y cols., 2006), modificación de la migración y diferenciación en queratinocitos (Brem y Tomic-Canic, 2007), elevación de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (Wetzler y cols., 2000; Eming y cols., 2007a; Peppia y cols., 2009; Xu y cols., 2013), actividad proteasa elevada (Nwomeh y cols., 1999; Lobmann y cols., 2002; Falanga, 2004; Gill y Parks, 2008), superproducción

de ROS y ambiente prooxidativo (Schäfer y Werner, 2008a), fallos en la transición M1/M2 en macrófagos (Mantovani y cols., 2013; Wicks y cols., 2014), fracaso en la consecución de una contracción adecuada (Falanga, 2005), secreción reducida y modificaciones de los componentes de la matriz (Niu y cols., 2008; Schultz y cols., 2011), resistencia mecánica reducida (Berlanga-Acosta y cols., 2010), cambios en la población bacteriana (Scales y Huffnagle, 2013; Zhao y cols., 2013) y alteraciones en los procesos epigenéticos (Rafehi y cols., 2011).

Todas estas alteraciones, junto con otros factores tanto intrínsecos (neuropatías, problemas vasculares y otros efectos sistémicos causados por la diabetes) como extrínsecos (infección, formación de callo, presión local excesiva), desembocan en la discapacidad para la curación que frecuentemente presentan las úlceras diabéticas (Greenhalgh, 2003; Jeffcoate y Harding, 2003; Falanga, 2004; Falanga, 2005; Galiano y cols., 2004b; Blakytyn y Jude; 2006; Wicks y cols., 2014).

### **1.3.3 Terapias para la cicatrización comprometida**

Dada la gran prevalencia de las heridas crónicas, se han empleado para su tratamiento multitud de terapias, procedimientos y dispositivos para mejorar su progresión. En la mayoría de los casos, las terapias aplicadas intentan actuar sobre uno o varios de los procesos alterados en la cicatrización comprometida. Entre estas estrategias se incluye el control de la infección, el suplemento de mediadores, la modulación de la inflamación, etc. (Menke y cols., 2007; Boateng y cols., 2008). A continuación se exponen brevemente las terapias más empleadas y aquellas que están sufriendo un mayor desarrollo en los últimos años.

#### *Limpieza y desbridamiento de la herida*

Las heridas con tejido necrótico no progresarán en la granulación y epitelización hasta que este sea eliminado. El desbridamiento supone una importante ayuda en este proceso, limitando la colonización bacteriana y los riesgos de infección, a la vez que produce una reactivación de la herida en un intento por retornar a la fase aguda, favoreciendo su cicatrización. Su realización puede llevarse a cabo mediante métodos

quirúrgicos, mecánicos, enzimáticos o biológicos, y se considera el tratamiento estándar para las úlceras de pie de diabético. A pesar de la aparición de nuevas terapias, se sigue considerando actualmente que el desbridamiento debe ser una parte integral del tratamiento de heridas crónicas (Stadelmann y cols., 1998; Saap y Falanga, 2002; Steed, 2004; Menke y cols., 2007; Barrientos y cols., 2008).

### *Descarga y corrección posicional*

Diversos traumas o presiones sostenidas en una zona pueden dar lugar a heridas por isquemia-reperfusión, teniendo una especial importancia en los casos de úlceras de decúbito y de pie de diabético. Es necesario en estos casos aliviar las cargas a las que se somete la herida para minimizar el daño tisular. Para ello, se emplean diversas estrategias y dispositivos adecuados a cada tipo de lesión, como colchones y/o acolchamientos especiales, reposicionamiento frecuente o férulas de contacto total para la redistribución del peso (Greenhalgh, 2003; Brem y cols., 2006; Mustoe y cols., 2006; Menke y cols., 2008).

### *Apósitos*

Para prevenir daños mayores en heridas de cicatrización lenta es recomendable la utilización de apósitos, de los existe una gran variedad en material y forma, desde los más tradicionales, como las gasas estériles de algodón, hasta los más modernos, entre los que se incluyen hidrocoloides, alginatos e hidrogeles, disponibles como películas, espumas o geles. Adicionalmente, los diferentes apósitos pueden ser funcionalizados con distintas sustancias, como compuestos antimicrobianos, promotores de la cicatrización o suplementos. Distintos tipos de herida pueden requerir diferentes dispositivos, dependiendo de las características de la lesión y del material (Boateng y cols., 2008; Menke y cols., 2008).

### *Tratamientos con moléculas bioactivas*

Desde finales de los años 70, el uso de citoquinas y factores de crecimiento exógenos aplicados de forma tópica ha sido planteado con la intención de equilibrar los niveles de dichas moléculas, los cuales se encuentran alterados en las heridas crónicas. De esta manera, se pretende favorecer una transición desde un estado degradativo e

inflamatorio hacia otro más sintético y proliferativo. Distintos factores han sido investigados como terapias tópicas, como PDGF, FGF2, factor de crecimiento epidérmico (EGF), VEGF y TGF- $\beta$ , aunque hasta la fecha tan solo el uso tópico de Becaplermin (PDGF-BB) ha mostrado suficiente eficacia en estudios clínicos robustos. Asimismo, su utilidad se encuentra también limitada debido a la corta vida de estas proteínas en el ambiente marcadamente proteolítico que suponen las heridas crónicas, limitando en gran medida la eficacia de estos tratamientos (Bennet y cols., 2003; Menke y cols., 2007; Metcalfe y Ferguson, 2007b; Menke y cols., 2008; Bao y cols., 2007; Eming y cols., 2010; Schultz y cols., 2011; Günter y Machens, 2012).

### Terapia celular

En los últimos años, se ha planteado el uso de células vivas como terapia para mejorar la cicatrización comprometida. Aunque se han empleado células diferenciadas como fibroblastos y queratinocitos, las células madre, debido a sus capacidades proliferativas y de diferenciación hacia distintos tipos celulares, así como su capacidad para secretar reguladores solubles, son los candidatos ideales para este tipo de tratamientos. Se han probado distintos tipos, entre los que se encuentran las células madre de médula ósea y las procedentes de distintos tejidos, como muscular, adiposo, epitelial, etc., con resultados prometedores, tanto por sí solas como en conjunción con distintas matrices y/o moléculas bioactivas (Buján y cols., 2006; Cha y Falanga, 2007; Metcalfe y Ferguson, 2007b; Chen y cols., 2009a; Günter y Machens, 2012; Hocking, 2012; Hu y cols., 2014).

### Sustitutos cutáneos

Diversos tipos de constructos y equivalentes cutáneos/dérmicos han sido utilizados para intentar mejorar la cicatrización de heridas comprometidas, con la intención de proteger la zona y a la vez conseguir un ambiente similar al de la matriz perdida. Los materiales más empleados en su fabricación son componentes naturales de la matriz, como el colágeno o la tropoelastina, tanto de origen humano como de otras especies (principalmente de origen bovino y porcino), así como sustancias sintéticas o de origen mixto. Asimismo, la posibilidad de su funcionalización con factores procicatrizantes y/o distintos tipos celulares ofrecen múltiples opciones para su aplicación terapéutica



(Ruszczak, 2003; Broughton y cols., 2006; Dinh y Veves, 2006; Cha y Falanga, 2007; Metcalfe y Ferguson, 2007b; Chen y cols., 2009a; Téot y cols., 2011; van der Veen y cols., 2011; Günter y Machens, 2012; Kamel y cols., 2013).

### Otras terapias

Además de las arriba indicadas, otras terapias han sido utilizadas para el tratamiento de heridas crónicas y úlceras diabéticas, con mayor o menor eficacia y evidencia que las apoye. Entre ellas se incluyen la electroestimulación, la terapia hiperbárica, la hidroterapia, los tratamientos con presión negativa, la terapia con ultrasonidos, etc. (Falanga y cols., 2005; Brem y cols., 2006; Broughton y cols., 2006; Mustoe y cols., 2006; Menke y cols., 2007; Kranke y cols., 2012).

## **1.4 FACTORES DE CRECIMIENTO Y CITOQUINAS EN LA CICATRIZACIÓN**

El éxito del proceso cicatrizal depende de la acción de múltiples factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas envueltas en una compleja red de señalización que coordina los procesos celulares. El desarrollo de las tecnologías de ratones transgénicos y *knock-out* ha permitido un gran avance en la dilucidación de las funciones de las citoquinas en los procesos de embriogénesis y de cicatrización, tanto normal como comprometida. Aunque quedan aún muchas incógnitas sobre las funciones e implicaciones de muchos mediadores, se han identificado varias familias de factores de crecimiento y citoquinas con importantes implicaciones en el proceso reparativo (Werner y Grose, 2003; Barrientos y cols., 2007). Aquellas más relevantes y sobre las que existen más estudios y evidencias se desarrollan a continuación.

### **1.4.1 PDGF**

Los PDGFs conforman una familia de factores de crecimiento homo o heterodiméricos, entre los que se incluyen PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC y PDGF-DD, y ejercen sus funciones al unirse a tres receptores transmembrana tirosina-quinasa distintos, los

cuales pueden ser homo o heterodímeros de cadenas  $\alpha$  o  $\beta$  (Werner y Grose, 2003). Asimismo, dentro de la familia del PDGF se engloba la subfamilia del VEGF, que será tratada más adelante.

Tras la lesión, la degranulación de las plaquetas provoca la liberación de grandes cantidades de PDGF. Sus niveles permanecen elevados en el fluido de la herida, especialmente durante las primeras etapas, ejerciendo su acción mediante un mecanismo paracrino. Además de las plaquetas, el PDGF es producido por macrófagos, endotelio vascular, fibroblastos, queratinocitos y mastocitos (Werner y Grose, 2003; Barrientos y cols., 2008). Dentro de los múltiples efectos de estos factores de crecimiento, tienen especial importancia las acciones quimiotácticas sobre neutrófilos, monocitos y fibroblastos, inducción de epitelización, así como la inducción de la proliferación y síntesis de matriz por parte de estos últimos y, en estadios más avanzados de la cicatrización, su diferenciación hacia miofibroblastos (Werner y Grose, 2003; Barrientos y cols., 2008).

#### 1.4.2 TGF- $\beta$

La familia del TGF- $\beta$  incluye a sus tres isoformas (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3), las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y las activinas. Las tres isoformas del TGF- $\beta$  son sintetizadas como precursores, secretadas usualmente como un complejo con la proteína de unión a TGF- $\beta$  latente, la cual es eliminada extracelularmente por proteólisis. Asimismo, en los procesos de liberación y activación de este factor de crecimiento también participan estímulos mecánicos. Durante la reparación cutánea, la proteína predominante es el TGF- $\beta$ 1, producido principalmente por macrófagos, fibroblastos, queratinocitos, plaquetas y mastocitos, y ejerce su acción por la unión a un receptor heterodimérico (tipo I más tipo II), ambos serina-treonina quinasas, uniéndose adicionalmente a un receptor no señalizador tipo III, encargado de presentar la molécula al receptor tipo II. Tras su activación, los receptores actúan activando las rutas de señalización de la familia de los factores de transcripción Smad (Werner y Grose, 2003; Barrientos y cols., 2008; Hinz, 2010; Finnson y cols., 2013).

En la cicatrización, el TGF- $\beta$ 1 tiene importancia en los procesos de inflamación, angiogénesis, reepitelización y regeneración del tejido conectivo. Su actividad se mantiene a lo largo de todo el proceso, gracias tanto a la síntesis como a la acumulación de la forma inactiva, asegurando una provisión continua. Se ha descrito su actividad favorecedora de la síntesis y contracción del tejido de granulación, desbridamiento por parte de macrófagos, modulación del componente inflamatorio, inducción de la diferenciación de miofibroblastos, así como migración e inhibición de la proliferación de queratinocitos. Del mismo modo, la isoforma TGF- $\beta$ 3 también se encuentra implicada en procesos de curación, habiéndose descrito su importancia en la reducción de la formación de cicatriz (Desmoulière y cols., 1993; Werner y Grose, 2003; Hinz, 2007; Barrientos y cols., 2008; Ariel y Timor, 2013; Finnson y cols., 2013; Pakyari y cols., 2013).

### 1.4.3 VEGF

La familia del factor de crecimiento del endotelio vascular, considerada como una subfamilia dentro de la familia del PDGF, incluye al VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y al factor de crecimiento placentario (PGF). Para llevar a cabo sus acciones biológicas, estos ligandos se unen a tres tipos de receptores transmembrana tirosina-quinasa (VEGFR-1, 2 y 3). De todos ellos, el mejor caracterizado a nivel funcional es el VEGF-A, junto con sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 (Werner y Grose, 2003).

El VEGF-A, un regulador capital de la vasculogénesis y la angiogénesis durante el desarrollo, también tiene una importancia crucial en los procesos de reparación cutánea. Tras la lesión, este factor es liberado por las plaquetas, y se ha comprobado que su expresión se induce principalmente en queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, células musculares lisas, macrófagos y mastocitos, a la vez que sus receptores pueden encontrarse en la vasculatura del tejido de granulación. Este factor de crecimiento favorece la permeabilidad vascular y provoca la migración y proliferación de las células endoteliales, dando comienzo a la revascularización de la herida. Además de los efectos sobre la regeneración vascular, este factor de crecimiento también actúa contribuyendo a los procesos de epitelización y síntesis de

colágeno (Werner y Grose, 2003; Eming y Krieg, 2006; Bao y cols., 2008; Barrientos y cols., 2008). También se ha descrito la participación de otros miembros de esta familia en la curación de heridas. El PGF parece ser un importante regulador de la angiogénesis, y es capaz de actuar en sinergia con el VEGF-A. A su vez, el VEGF-C parece ser el principal responsable del restablecimiento de la red linfática tras la lesión, ya que es un potente inductor de la linfangiogénesis (Werner y Grose, 2003; Barrientos y cols., 2008).

#### 1.4.4 FGF

La familia de los factores de crecimiento fibroblásticos incluye 23 miembros, que ejercen su acción gracias a su unión a cuatro receptores transmembrana de alta afinidad tipo tirosina-quinasa (FGFR1-4) (Werner y Grose, 2003). Los diferentes miembros de la familia muestran distinta afinidad frente a los receptores (y sus variantes), pero un aspecto común a todos ellos es su capacidad de interacción con la heparina y el heparán sulfato, lo que limita su difusibilidad y les brinda una mayor resistencia a la proteólisis y a la desnaturalización térmica (Werner y Grose, 2003), aumentando de este modo su vida media y su capacidad de acción.

Los miembros de esta familia poseen en su mayoría un amplio espectro mitogénico, con la excepción del FGF7 (o KGF), cuya acción parece ser más específica sobre células epiteliales. También están implicados en otros procesos, como la supervivencia celular o la síntesis y remodelación de matriz, aunque de ellos cabe destacar el efecto angiogénico, particularmente estudiado y descrito en el caso del FGF1 y FGF2 (también conocidos como FGFs ácido y básico, respectivamente) (Werner y cols., 1994; Werner y Grose, 2003; Eming y cols., 2007a; Barrientos y cols., 2008). Los principales tipos celulares que secretan FGFs son los queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, células musculares lisas, condrocitos y mastocitos. Durante los procesos de cicatrización cutánea se han descrito incrementos en la presencia de estos factores de crecimiento, siendo los más estudiados los miembros 1, 2, 7 y 10. De ellos, el que desempeña un papel más importante durante la cicatrización parece ser el FGF2 (Werner y Grose, 2003; Barrientos y cols., 2008).

### 1.4.5 EGF

Los miembros más conocidos y estudiados de la familia del factor de crecimiento epidérmico son el propio EGF, el factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) y el factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina (HB-EGF), aunque también se incluyen moléculas como la anfirregulina, epirregulina, neurregulina y betacelulina, entre otras. Todos ellos llevan a cabo sus acciones mediante la unión a cuatro tipos de receptores diferentes, y son sintetizados como proteínas transmembrana, pudiendo escindirse por proteólisis. Esto permite que además de la señalización paracrina tras la liberación, pueda producirse otra de tipo yuxtacrino. Las principales fuentes de EGF durante la cicatrización son las plaquetas, los fibroblastos, los macrófagos y los propios queratinocitos (Werner y Grose, 2003; Barrientos y cols., 2008).

Distintos estudios han demostrado el efecto positivo sobre los procesos cicatrizales del EGF, TGF- $\alpha$  y HB-EGF. Su presencia y la de sus receptores aumentan tras la lesión, y ejercen una acción favorable sobre los procesos de reepitelización y formación de tejido de granulación, lo que nos indica la importante implicación de estos factores en la curación de heridas (Werner y Grose, 2003; Shirakata y cols., 2005; Barrientos y cols., 2008).

### 1.4.6 Citoquinas

Las citoquinas son proteínas secretadas de pequeño tamaño, que afectan al comportamiento de células inmunitarias, así como otros tipos celulares. En esta categoría se incluyen las **interleuquinas**, las **linfoquinas** y otras moléculas como el TNF- $\alpha$  y los interferones (IFN). Las **quimioquinas**, o citoquinas quimiotácticas, son una subclase de pequeñas citoquinas que estimulan la quimiotaxis y la extravasación de leucocitos, aunque también participan en los procesos de epitelización, angiogénesis y diferenciación miofibroblástica (Werner y Grose, 2003; Mantovani y cols., 2004; Martins-Greens y cols., 2013).

### IL-1

Es producida por neutrófilos, monocitos, macrófagos y queratinocitos, y tras la lesión es inmediatamente liberada por estos últimos, comenzando la respuesta inflamatoria. Es también capaz de favorecer la migración y proliferación de queratinocitos, así como la activación de fibroblastos, y se encuentra implicada en procesos de fibrosis (Werner y Grose, 2003; Barrientos y cols., 2008; Artlett, 2013).

### IL-6

La interleuquina-6 es sintetizada principalmente por neutrófilos, macrófagos y linfocitos T, así como por queratinocitos durante la reparación cutánea, y está implicada en la respuesta inflamatoria asociada a la cicatrización. Posee un efecto proliferativo para queratinocitos, es quimiotáctica para neutrófilos, y su exceso de actividad se asocia a un efecto de cicatrización hipertrófica (Gallucci y cols., 2000; Werner y Grose, 2003; Hinz, 2007; Barrientos y cols., 2008).

### IL-10

Esta interleuquina, una de las principales citoquinas antiinflamatorias, es producida por los macrófagos infiltrados, linfocitos T y queratinocitos de los márgenes de la herida, y se le asocia una acción antifibrótica en los procesos cicatrizales. Tiene un papel fundamental en la limitación y resolución de la respuesta inflamatoria, produciendo una menor expresión de mediadores proinflamatorios (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-12, etc.) y aumentando la de moléculas antiinflamatorias. Adicionalmente, regula el crecimiento y/o diferenciación de varias células inmunitarias, así como de queratinocitos y células endoteliales (Werner y Grose, 2003; Eming y cols., 2007b; Ariel 2013; King y cols., 2014).

### TNF- $\alpha$

Producida principalmente por macrófagos y neutrófilos infiltrados, así como por mastocitos, linfocitos T y fibroblastos, especialmente en las primeras etapas tras la lesión. La actividad de esta citoquina se asocia a una inflamación elevada y retraso en la cicatrización. Su presencia produce la activación de macrófagos, actuando también

como mitógeno de fibroblastos e inductor de angiogénesis (Werner y Grose, 2003; Broughton y cols., 2006).

### IFN- $\gamma$

Esta citoquina, producida principalmente por células NK y linfocitos Th1, es crítica en la respuesta inmunitaria, siendo un potente inductor de las defensas contra virus y bacterias. Su inducción ejerce múltiples efectos sobre macrófagos, células NK y linfocitos T, y durante el proceso cicatrizal se le han asociado acciones inhibitorias sobre la angiogénesis, la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno (Ishida y cols., 2004; Lombann y cols., 2005; Broughton y cols., 2006; Shen y cols., 2012).

#### **1.4.7 Otros**

Además de los arriba expuestos, existen otras familias de factores de crecimiento que han demostrado tener influencia sobre el proceso reparativo. Algunas de ellas, así como sus integrantes más estudiados, son las angiopoyetinas, los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs), los factores de dispersión (factor de crecimiento hepatocítico o HGF), las neurotrofinas (NGF), la familia CCN (factor de crecimiento de tejido conectivo o CTGF) y el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Werner y Grose, 2003; Broughton y cols., 2006).

## **1.5 MODELOS EXPERIMENTALES DE CICATRIZACIÓN**

Aunque el estudio y el conocimiento de la cicatrización en humanos han avanzado considerablemente, las dificultades y limitaciones que plantea hace que sea necesario el empleo de modelos experimentales para la investigación en este campo.

Las “3Rs” en la experimentación animal (*reducción, refinamiento y reemplazo*), descritas en 1959 por Russel y Burch, promueven el desarrollo de alternativas a la experimentación con animales. Para ello, se han desarrollado distintas aproximaciones *in vitro* para el modelado del proceso cicatrizal. Estas incluyen desde cultivos celulares simples hasta constructos más complejos (equivalentes cutáneos) que emplean varios

tipos celulares y diferentes componentes matriciales, así como modelos *ex vivo*, procedentes tanto de humanos como de otros mamíferos. Sin embargo, la gran complejidad de los procesos reparativos y sus múltiples interacciones con diferentes sistemas del organismo vivo hacen que estos modelos resulten insuficientes para el estudio. A causa de ello, aunque la experimentación *in vitro* y *ex vivo* resulte útil y sea empleada para ciertas investigaciones y pruebas farmacológicas, la necesidad de utilizar modelos *in vivo* para el estudio del proceso reparativo resulta innegable (Ansell y cols., 2012).

Sin lugar a dudas, los modelos más usados en la literatura son los realizados en **ratón** o **rata**, tanto en heridas incisionales (cicatrización por primera intención) como excisionales (cicatrización por segunda intención). Su fácil manejo, mantenimiento y disponibilidad de cepas transgénicas hacen que sea el modelo de elección por la mayoría de los investigadores (Dorsett-Martin, 2004; Eming y cols., 2007a; Ansell y cols., 2012). Sin embargo, ha de tenerse en cuenta las diferencias en la anatomía y fisiología de la piel y los procesos de cicatrización existentes con relación a los humanos. En estos animales, la piel posee un panículo carnoso y un anclaje laxo al tejido subyacente. Esto hace que el cierre de los defectos experimentales se lleve a cabo principalmente por contracción del tejido, lo cual limita la extrapolación de resultados (Ansell y cols., 2012; Davidson y cols., 2013). Entre las alternativas existentes para paliar este problema se encuentran el uso de modelos de piel firme, como la oreja del conejo o los modelos porcinos, así como el empleo de estrategias de fijación de los bordes de la herida en roedores mediante marcos rígidos o flexibles (Galiano y cols., 2004a; Buján y cols., 2006; Ansell y cols., 2012; Davidson y cols., 2013; Park y cols., 2014).

Asimismo, se han desarrollado en los últimos años distintos modelos para la investigación de la **reparación sin cicatrización** (*scarless healing*), entre los que se incluyen los embriones de pez cebra y *Xenopus laevis*, así como de mamíferos, como oveja y ratón (Ansell y cols., 2012).



### 1.5.1 Modelos de cicatrización comprometida

Para estudiar los distintos tipos de cicatrización comprometida se han ido desarrollando a lo largo de los años distintos modelos animales en un intento por reproducir la fisiología alterada y su efecto sobre la reparación de distintas patologías. Entre ellas la más importante es la diabetes, aunque también han sido descritos modelos para otras condiciones tales como la edad avanzada (modelo de extirpación ovárica), isquemia tisular (modelos de colgajo o *flap* y de isquemia quirúrgica en oreja de conejo) y úlceras por presión (modelos de isquemia/reperfusión con imanes y dispositivos compresores) (Buján y cols., 2006; Ansell y cols., 2012).

Para el estudio de la diabetes, los modelos más comúnmente empleados son la rata y el ratón. Para la **diabetes tipo I**, los más utilizados son los ratones genéticamente deficientes diabéticos no obesos (NOD) y la inducción de diabetes por estreptozotocina (Ansell y cols., 2012; Wicks y cols., 2014). Este compuesto, análogo estructural de la glucosa, es reconocido selectivamente por el transportador de glucosa GLUT-2, el cual es muy abundante en las células  $\beta$  del páncreas. Debido a su toxicidad, su administración resulta en la destrucción selectiva de estas células, produciendo la patología diabética (Schnedl y cols., 1994; Wang y Gleichmann, 1998; Bolzán y Bianchi, 2002; Tesch y Allen, 2007). Por otro lado, los modelos más frecuentes de **diabetes tipo II** incluyen los ratones mutantes para leptina (ob/ob o Lep -/-) y los mutantes para su receptor (db/db o Lepr -/-) (Ansell y cols., 2012; Wicks y cols., 2014).

En cualquier caso, ha de tenerse en cuenta que todos los modelos presentan limitaciones ya que, por definición, nunca reproducirán exactamente los fenómenos y procesos de la reparación cutánea humana que pretenden estudiarse. Por tanto, la traslación de los resultados obtenidos a la práctica clínica ha de realizarse con suma cautela. No obstante, estos modelos son la herramienta más potente de la que se dispone para la investigación de los procesos cicatrizales, por lo que actualmente su empleo sigue siendo imprescindible.

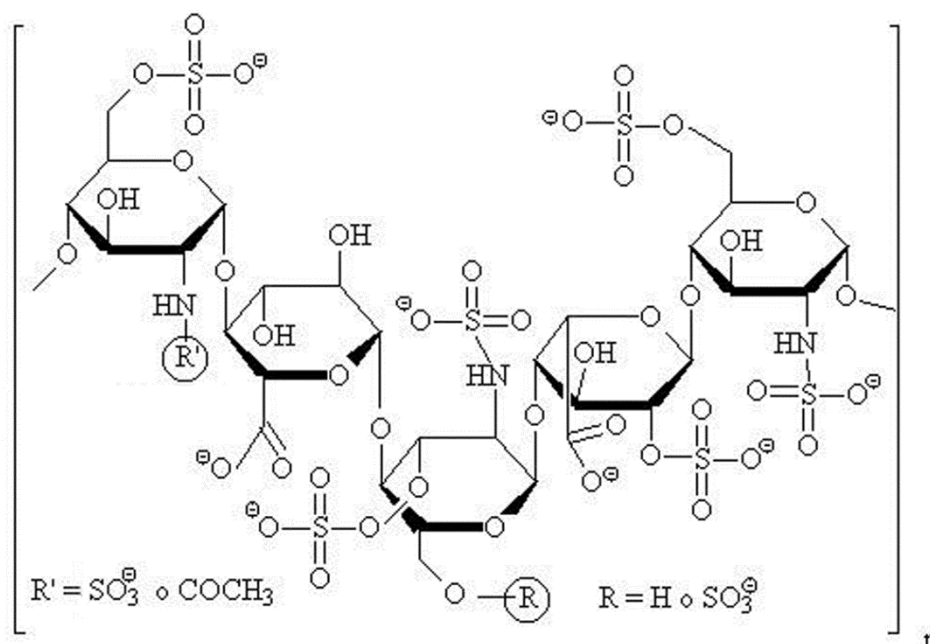
## 1.6 HEPARINAS

### 1.6.1 Heparina no fraccionada

La **heparina** es una mezcla heterogénea de glicosaminoglicanos ramificados, cuyas propiedades antitrombóticas fueron descubiertas hace casi un siglo. Se encuentra principalmente en los gránulos de basófilos y mastocitos, y su obtención se lleva a cabo mediante su aislamiento a partir de tejidos animales, como el intestino porcino o el pulmón bovino (Hirsh y Raschke, 2004). Aunque su función fisiológica no ha sido completamente dilucidada, dado que los tejidos que contienen heparina son aquellos que soportan una mayor interacción con el medio externo, se postula que pueda estar implicada en procesos de defensa, como la inflamación (Peplow, 2005; Li y Vlodavsky, 2009).

El polímero de la heparina consiste en una repetición básica de un disacárido compuesto por ácido L-idurónico y D-glucosamina, unidos por un enlace  $\alpha(1\rightarrow4)$ , con un grado variable de sulfatación y N-acetilación (**Figura 4**). Su peso molecular se encuentra entre 3000 y 30000 Da, con un valor medio de 15000 Da (aproximadamente 45 monosacáridos) (Faham y cols., 1996; Hirsh y Raschke, 2004; Sakiyama-Elbert, 2014). La abundancia de cargas negativas presentes en este polímero le confiere una gran capacidad para interactuar con multitud de proteínas, como proteasas, factores de crecimiento y citoquinas, siendo la razón de sus propiedades, tanto anticoagulantes como de otros tipos (Faham y cols., 1996; Peplow, 2005; Liang y Kiick, 2014).

Aunque su uso como anticoagulante ha sido extenso, la heparina no fraccionada posee ciertas limitaciones importantes, entre las que se encuentran las complicaciones hemorrágicas, la osteoporosis asociada a su uso, la trombocitopenia inducida por heparina y las limitaciones farmacocinéticas. Por ello, durante las últimas décadas se han buscado y desarrollado fármacos alternativos para algunas de sus aplicaciones (Hirsch y cols., 2007; Nowak, 2009).



**Figura 4:** Estructura química de la heparina

### 1.6.2 Heparinas de bajo peso molecular

Se conocen como **heparinas de bajo peso molecular** (LMWH) a las fracciones obtenidas por despolimerización química o enzimática de la heparina no fraccionada (UFH), cuyo peso molecular medio se encuentre entre 2000 y 9000 Da, con un peso medio de 5000 Da (aproximadamente 15 monosacáridos por molécula). Aquellas preparaciones cuyo peso sea menor de 4000 Da son consideradas LMWH de segunda generación (Fernández Pavón, 2004; Hirsh y Raschke, 2004). Actualmente existen varios tipos disponibles, entre los que se incluyen enoxoparina, dalteparina, reviparina, tinzaparina y bemiparina, y se prevé que en un corto periodo de tiempo aparezcan más productos biosimilares, debido a la expiración de patentes. Estas LMWH han demostrado mejor biodisponibilidad y vidas medias más largas comparadas con las no fraccionadas, y también se les asocia una menor incidencia de complicaciones, por lo que actualmente han reemplazado a la UFH como tratamiento de elección para muchas indicaciones, como la prevención y el tratamiento del tromboembolismo venoso (Hirsh y Raschke, 2004; Gray y Mulloy, 2009; Merli y Groce, 2010; Mousa, 2010).

La **bemiparina** es una heparina de bajo peso molecular obtenida mediante despolimerización química ( $\beta$  eliminación) en medio no acuoso de heparina no fraccionada procedente de mucosa porcina. Es considerada una LMWH de segunda generación, ya que se caracteriza por un peso molecular medio de 3600 Da, siendo aproximadamente un 85% de sus cadenas polisacáridas menores de 6000 Da. Sus actividades anti factores de coagulación son de aproximadamente 80-120 UI/mg (anti-Xa) y 5-20 UI/mg (anti-IIa), lo que hace que posea un ratio anti-Xa/IIa de aproximadamente 8:1, mayor que el de otras heparinas de bajo peso molecular, como enoxoparina, dalteparina, reviparina y tinzaparina. Este elevado ratio le confiere gran poder antitrombótico con un menor riesgo de sangrado, y es principalmente consecuencia de la menor longitud de cadena que presenta esta LMWH (Chapman y Goa, 2003; Fernández Pavón, 2004; Miras-Parra y cols., 2005; Gerotziafas y cols., 2007; Martínez-González y Rodríguez, 2010; Ciccone y cols., 2014).

### 1.6.3 Heparinas y cicatrización

Aunque tradicionalmente las heparinas han sido utilizadas como anticoagulantes, estas moléculas presentan otros tipos de actividades en diversos procesos, algunos de los cuales han mostrado ser relevantes y potencialmente útiles en el tratamiento de heridas comprometidas.

Una de las principales características de las heparinas relacionadas con la reparación tisular es su capacidad para unirse a factores de crecimiento, como los FGFs, VEGF y HGF. Esta interacción provoca un incremento en la actividad de dichos factores, a la vez que aumenta su vida media y les confiere una mayor resistencia a la proteólisis y otras modificaciones (Faham y cols., 1996; Kratz y cols., 1998; Nissen y cols., 1999; Norrby y Nordenhem, 2010; Liang y Kiick, 2014).

Estudios realizados en los últimos años han indicado una capacidad de las heparinas, tanto sin fraccionar como de bajo peso molecular, en la modulación de la respuesta inflamatoria (Dandona y cols., 1999; Salas y cols., 2000; Hochart y cols., 2008; Mousa, 2010). También se han descrito actividades favorecedoras de la síntesis de colágeno durante la reparación tisular (Kus y Bienkiewicz, 2006), así como efectos beneficiosos

en la curación de distintos tipos de lesiones, como úlceras gástricas (Li y cols., 2001), anastomosis intestinales (Gunerhan y cols., 2006; Ergul y cols., 2009) y úlceras en pacientes diabéticos (Kalani y cols., 2003; Rullan y cols., 2008),

Asimismo, en los últimos años se han llevado a cabo estudios en el campo de la oncología sobre su posible actividad para inhibir el crecimiento de tumores, metástasis, y angiogénesis (Norrby, 2006; Mousa, 2010; Van Sluis y cols., 2010; Vignoli y cols., 2011; Ma y cols., 2012).

## 1.7 BIOMATERIALES

La definición más aceptada es la empleada por el Instituto Nacional de la Salud americano, que describe a los biomateriales como *“cualquier sustancia o combinación de sustancias, diferentes de drogas, sintéticas o de origen natural, que pueden ser usadas durante cualquier periodo de tiempo, aumentando o reemplazando parcial o totalmente cualquier tejido, órgano o función del cuerpo, con la finalidad de mantener o mejorar la calidad de vida del individuo”*.

Para su uso, estos materiales deben cumplir las condiciones de no presentar toxicidad ni carcinogenicidad, ser biocompatibles y biofuncionales y presentar propiedades mecánicas, físicas y/o químicas adecuadas para su aplicación en cuestión. El rango de su aplicación es amplio, incluyendo prótesis articulares, cementos óseos, implantes dentales, prótesis vasculares, sustitutos cutáneos, lentes de contacto e intraoculares, y un largo etcétera (Hench y Polak, 2002; Holzapfel y cols., 2013).

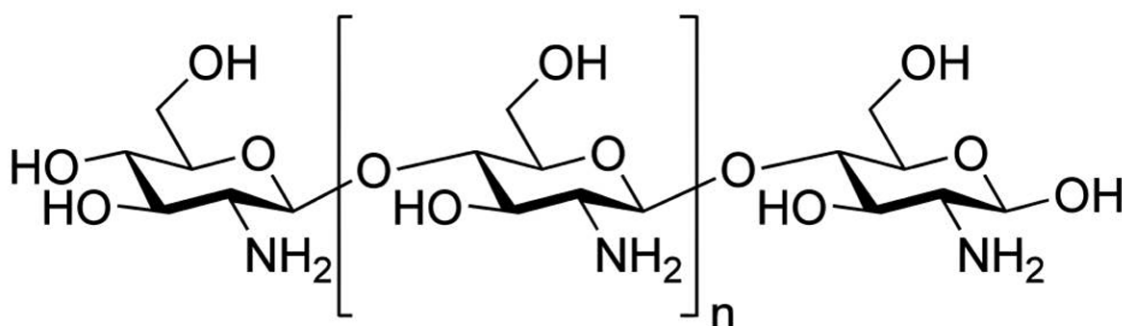
### 1.7.1 Tipos de biomateriales

A lo largo de la historia se han empleado una gran variedad de materiales, los cuales se agrupan principalmente en metálicos, cerámicos, poliméricos y compuestos. Según la respuesta tisular provocada por los biomateriales, estos pueden englobarse en tres categorías principales. Los **inertes** (hablando más estrictamente, casi inertes) provocan una respuesta tisular mínima; los materiales **bioactivos** promueven el anclaje del

tejido receptor y favorecen la integración al estimular el crecimiento de nuevo tejido; y los materiales **biodegradables** o **bioabsorbibles**, que son incorporados inicialmente en el tejido para acabar eliminándose completamente a lo largo del tiempo. Los implantes metálicos clásicos, como las aleaciones de cobalto-cromo y titanio, son típicamente inertes; las cerámicas pueden ser inertes, activas o absorbibles; y los polímeros pueden ser inertes o absorbibles. Asimismo, los biomateriales pueden ser de procedencia natural, cuando se emplean materiales presentes en los organismos vivos, o fabricados sintéticamente (Hench y Polak, 2002; Metcalfe y Ferguson, 2007a; Holzapfel y cols., 2013).

### 1.7.2 Quitosano

El **quitosano** es un polímero de glucosamina y, en menor grado, N-acetilglucosamina unidas por enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$  (**Figura 5**). Su obtención proviene de la desacetilación de la **quitina** (poli-N-acetilglucosamina), la cual es el segundo polímero más abundante en la naturaleza tras la celulosa, encontrándose en las paredes celulares de los hongos, el exoesqueleto de artrópodos como crustáceos e insectos, y algunas estructuras de moluscos (Dai y cols., 2011; Holzapfel y cols., 2013).



**Figura 5:** Estructura química del quitosano en estado de completa desacetilación.

Como biomaterial, el quitosano es biocompatible, biodegradable y no tóxico, y durante los últimos años ha sido ampliamente utilizado en diversas aplicaciones terapéuticas debido a sus interesantes propiedades y a su gran versatilidad. Este polímero puede ser procesado solo o combinado con otros materiales para formar hidrogeles,

membranas, nanofibras, perlas, micro/nanopartículas, andamiajes y esponjas, y se han desarrollado diferentes derivados del mismo para mejorar sus características. Su naturaleza catiónica permite su interacción con moléculas aniónicas, como glicosaminoglicanos y proteoglicanos, lo que hace de este polímero un eficiente portador de moléculas bioactivas (Dai y cols., 2011; Holzapfel y cols., 2013; Azuma y cols., 2015).

Además de sus propiedades como biomaterial, el quitosano posee ciertas características muy relevantes para su uso en el tratamiento de lesiones cutáneas. Este material presenta actividades antimicrobianas propias, favorece un ambiente húmedo en la herida, posee capacidades hemostáticas, es capaz de modular el proceso inflamatorio y promueve la granulación y organización durante la reparación (Ueno y cols., 2001; Boateng y cols., 2008; Dai y cols., 2011; Holzapfel y cols., 2013; Azuma y cols., 2015). Debido a ello, el quitosano resulta un muy adecuado candidato para su empleo sobre heridas de difícil curación como las úlceras diabéticas.





# **HIPÓTESIS DE TRABAJO**



## 2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Durante los últimos años, la incidencia mundial de la diabetes mellitus ha ido en aumento, y se prevé que en las próximas décadas esta tendencia continúe debido al aumento global de la longevidad y al estilo de vida y hábitos nutricionales propios de los países desarrollados. La gran cantidad de complicaciones que provoca esta patología, entre las que se incluyen las úlceras asociadas a diabetes, supone un ingente gasto sanitario, así como importante factor en la disminución de la calidad de vida de la población.

A pesar de los importantes progresos en su tratamiento, este tipo de heridas sigue siendo hoy en día un grave problema de salud. Las profundas alteraciones del proceso cicatrizal que ocurren en estas lesiones provocan que en muchos casos la herida no consiga progresar favorablemente y se produzca una cronificación de la misma, llegando incluso a desembocar en la amputación de miembros. Debido a ello, el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de las úlceras asociadas a diabetes continúa siendo necesario.

Para lograr alcanzar una mejora efectiva en estas heridas, las estrategias empleadas deben ser capaces de compensar las alteraciones propias de la patología diabética que provocan el fallo en la cicatrización. Asimismo, con objeto de permitir su uso generalizado sobre los pacientes que sufren este tipo de lesión, las terapias desarrolladas deben evitar el uso de factores que requieran consideraciones especiales (como terapia celular o factores de crecimiento exógenos), ser fácilmente aplicables y presentar un coste económico asumible.

Entre las posibles sustancias a emplear, el quitosano y las heparinas, polímeros naturales que poseen propiedades beneficiosas para la cicatrización, representan una alternativa prometedora en el tratamiento de las heridas comprometidas por diabetes. El empleo conjunto de ambas en el diseño de apósitos podría ofrecer incluso mejores resultados en el tratamiento de este tipo de lesiones.

Estos hechos nos motivaron a plantearnos la siguiente **hipótesis** de trabajo:

*Es posible modular la cicatrización comprometida asociada a la diabetes mediante el empleo de hidrogeles de quitosano funcionalizados con heparina de bajo peso molecular y heparina no fraccionada, en un modelo experimental de cicatrización en rata diabética.*

Para llevar a cabo el contraste de esta hipótesis, se plantearon los siguientes **objetivos**:

- Estudio del efecto de la aplicación de hidrogeles de quitosano cargados con heparinas en un modelo experimental de cicatrización de defecto excisional en rata diabética inducida por estreptozotocina, analizando el proceso cicatrizal y su evolución a lo largo del tiempo.
- Valoración de la efectividad de los tratamientos aplicados, atendiendo a la respuesta inflamatoria, formación de nuevo tejido y maduración tisular, y comparación ente los distintos tipos de heparina.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 3 MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 PREPARACIÓN DE LOS HIDROGELES

Con el fin de conseguir un hidrogel de propiedades adecuadas, se realizaron diversas pruebas previas para optimizar tanto la composición del gel como su elaboración. Se llevaron a cabo titulaciones de las concentraciones de los distintos reactivos, así como variaciones en el orden de adición y en parámetros como la temperatura de mezcla (temperatura ambiente – 50 °C), agitación (manual, automática o ausencia) y tiempo de gelificación (1h – 24h). La composición y preparación descritas a continuación fueron seleccionadas atendiendo a la capacidad del gel resultante para la retención del agua incorporada y estabilidad, su adecuada consistencia y densidad para permitir su correcta extrusión y administración, y su pH cercano a 7.

#### 3.1.1 Reactivos

Para la elaboración de los hidrogeles se emplearon los siguientes reactivos y soluciones:

|   |               |
|---|---------------|
| - Quitosano (bajo peso molecular)           | Sigma-Aldrich |
| - Carboximetilcelulosa (CMC), sal sódica    | Sigma-Aldrich |
| - Glicerol                                  | Panreac       |
| - Metil p-hidroxibenzoato (metilparabeno)   | Sigma-Aldrich |
| - Propil p-hidroxibenzoato (propilparabeno) | Sigma-Aldrich |
| - Bicarbonato de sodio                      | Gibco®-LT     |
| - Heparina no fraccionada                   | Mayne Pharma  |
| - Bemiparina                                | Rovi          |
| - Ácido acético glacial                     | Panreac       |
| - Etanol                                    | Panreac       |
| - Agua desionizada                          |               |

### 3.1.2 Protocolo de preparación

Partiendo de los reactivos arriba mencionados, se prepararon las siguientes disoluciones de trabajo:

- Quitosano al 4% en ácido acético 0,2 M
- CMC al 2% en agua
- Metilparabeno al 10% en etanol
- Propilparabeno al 10% en etanol
- $\text{NaHCO}_3$  0,5 M en agua
- Heparina al 5% en agua
- Bemiparina al 5% en agua

La elaboración de los hidrogeles se llevó a cabo por adición secuencial sobre el quitosano de tres soluciones (A, B, y C) descritas más abajo. A continuación se detalla el protocolo para la preparación de 10 mL de hidrogel:

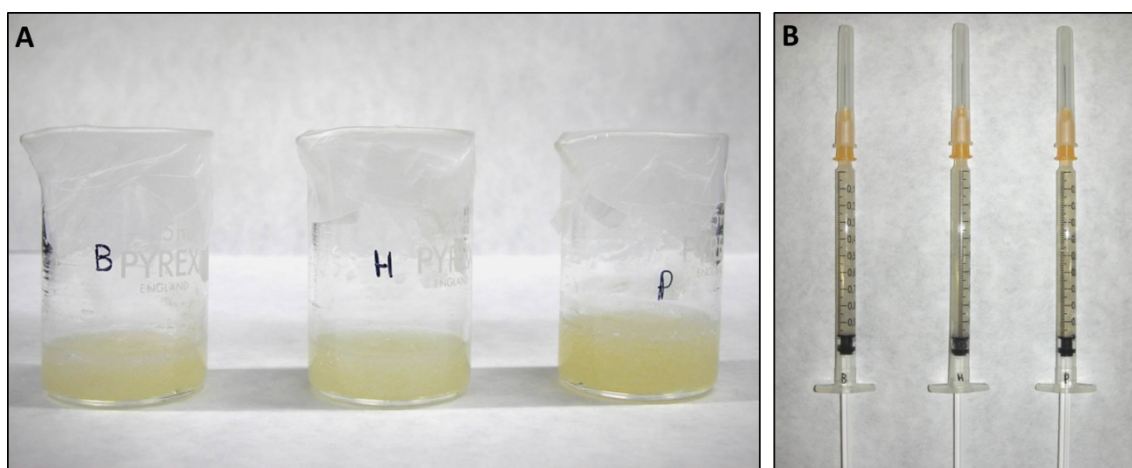
1. Preparar la **solución A**: Mezclar 1,0 mL de CMC 2% con 0,4 mL de heparina 5%, bemiparina 5% o agua, dependiendo del tipo de hidrogel a preparar (cargado con alguna de las heparinas o placebo).
2. Preparar la **solución B**: Mezclar 1,2 mL de glicerol con 0,1 mL de metilparabeno 10% y 0,01 mL de propilparabeno 10%.
3. Preparar la **solución C**: Mezclar 1,8 mL de  $\text{NaHCO}_3$  0,5 M con 0,49 mL de agua.
4. Sobre 5 mL de quitosano 4%, añadir la solución A. Mezclar vigorosamente hasta su completa homogeneización.
5. Añadir la solución B. Mezclar vigorosamente hasta su completa homogeneización.
6. Añadir la solución C. Agitar hasta conseguir un gel blanquecino homogéneo.
7. Cubrir y dejar gelificar a 4 °C durante 24 horas.



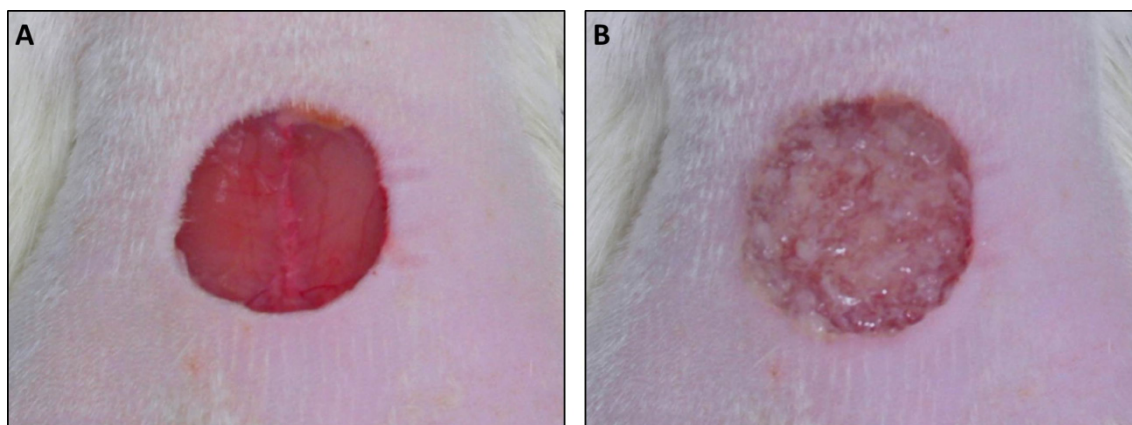
Las concentraciones finales de los componentes de los hidrogeles se detallan en la **Tabla 1**. Una vez preparado, el hidrogel fue fragmentado mecánicamente, extruido dos veces y cargado en jeringuillas de 1 mL para su dispensación en el momento de la intervención quirúrgica (**Figura 6**). Los geles mostraron suficiente consistencia y capacidad de permanencia, permitiendo una correcta y sencilla aplicación sobre el defecto (**Figura 7**)

| Compuesto      | Concentración final |
|----------------|---------------------|
| Quitosano      | 2%                  |
| CMC            | 0,2%                |
| Heparina*      | 0,2%                |
| Metilparabeno  | 0,1%                |
| Propilparabeno | 0,01%               |
| Glicerol       | 12%                 |

**Tabla 1:** Concentraciones finales de los componentes de los hidrogeles, expresadas como porcentaje m/V. (\*) Concentración de cada tipo de heparina en los geles HEP y BEM, ausente en PLCB.



**Figura 6:** A) Aspecto de los tres tipos de hidrogel (B: bemiparina, H: heparina, P: placebo) tras 24 horas a 4 °C. B) Hidrogeles cargados en jeringuillas de 1 mL para su aplicación.



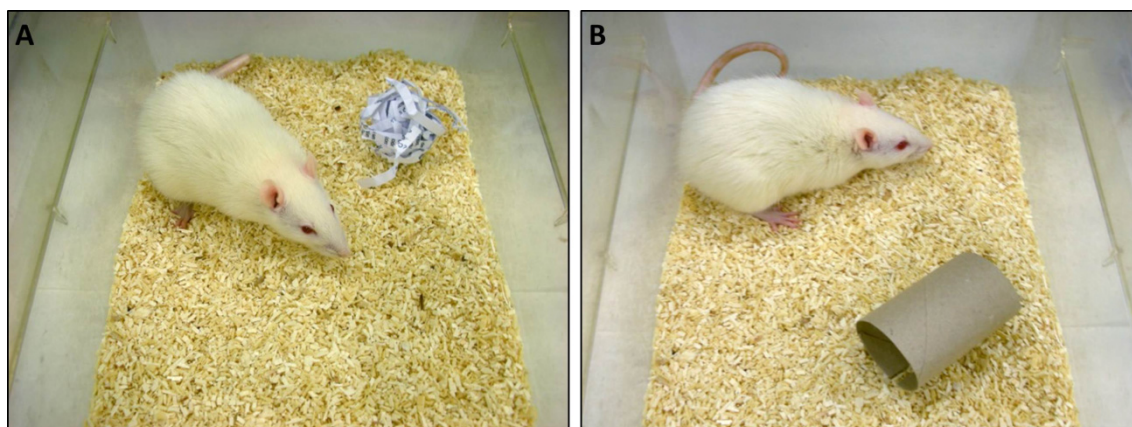
**Figura 7:** Aspecto del defecto excisional antes (A) y después de la aplicación del hidrogel (B).

## 3.2 EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Para la evaluación del efecto de los hidrogeles funcionalizados con heparinas sobre los procesos reparativos se empleó un modelo experimental de cicatrización cutánea en ratas a las que se les indujo una diabetes mellitus mediante tratamiento químico.

### 3.2.1 Animal de estudio

Durante el estudio se emplearon 150 ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar hembra, con pesos comprendidos entre 183 y 260 g. De ellas, 30 fallecieron como consecuencia de la severidad de la patología y/o de la intervención quirúrgica, quedando finalmente un total de 120 animales incluidos en el estudio. Desde el comienzo de los experimentos, los animales fueron estabulados individualmente bajo condiciones estándar de luz y temperatura, disponiendo de una dieta completa (Global diet, Harlan Laboratories Inc.) y agua *ad libitum*. Para minimizar el estrés, se proporcionó a las ratas enriquecimiento ambiental con rotación semanal (**Figura 8**). Todos los procedimientos realizados se llevaron a cabo de acuerdo con la guía de cuidados de animales de laboratorio (Real decreto 1201/2005) y la Directiva Europea (2010/63/UE). El protocolo experimental fue aprobado por el comité local de la Universidad de Alcalá de ética de experimentación animal.



**Figura 8:** Para la rotación del enriquecimiento ambiental, se alternaron semanalmente tiras de papel prensadas (A) y tubos de cartón (B).

### 3.2.2 Grupos experimentales

Los animales (n=120) fueron aleatoriamente distribuidos en cinco grupos de estudio:

- **CTRL-S**, n=24: ratas control no diabéticas
- **CTRL-D**, n=24: ratas control diabéticas
- **PLCB**, n=24: ratas diabéticas tratadas con hidrogel sin heparina (placebo)
- **HEP**, n=24: ratas diabéticas tratadas con hidrogel con heparina no fraccionada
- **BEM**, n=24: ratas diabéticas tratadas con hidrogel con bemiparina

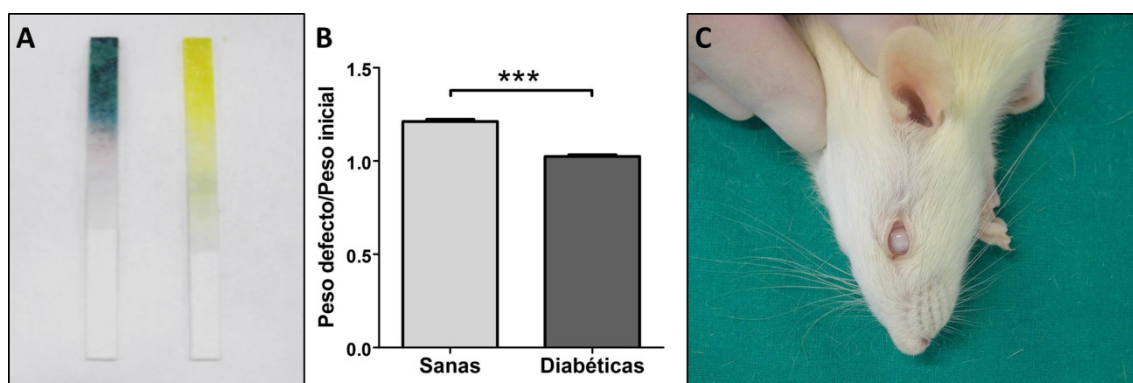
Los tiempos de estudio se establecieron en tres (t=3d), siete (t=7d), catorce (t=14d) y veintiún días (t=21d), tomando como punto de partida el momento de la realización del defecto excisional (t=0d). Para cada grupo experimental, una cuarta parte de los animales fue sacrificada en cada uno de los tiempos, obteniéndose un total de seis ratas (n=6) por cada grupo y tiempo de estudio.

### 3.2.3 Inducción y comprobación de la diabetes experimental

En los animales pertenecientes a los grupos CTRL-D, PLCB, HEP y BEM se indujo una diabetes tipo I experimental con estreptozotocina (STZ). Para ello, a los animales se les inyectó vía intraperitoneal una solución de STZ (Sigma-Aldrich) a una concentración de 30 mg/mL en tampón citrato 5 mM y pH 4,5. A cada animal le fue administrado un volumen en función de su peso, de manera que la dosis final para todos fuera de 60

mg de STZ por kg de peso. Transcurridos siete días desde la inducción, se comenzaron a realizar controles semanales de glucosa en orina mediante el uso de tiras reactivas (Inter-glucosa, Carulla Vekar). Aquellos animales que no presentaron síntomas tras la primera semana recibieron una segunda dosis de STZ. Tras la aparición de los síntomas indicativos de la diabetes, los animales se mantuvieron en observación durante 40 días para permitir el completo desarrollo de la patología y comprobar su estabilidad.

El desarrollo de la patología diabética fue confirmado mediante tiras reactivas para la detección de glucosa en orina, así como por la aparición de los síntomas clásicos de polidipsia, polifagia y poliuria. Los animales diabéticos sufrieron cambios morfológicos con respecto a sus controles sanos, mostrando un peso significativamente menor y un engrosamiento de la zona abdominal causado por un aumento de volumen del sistema digestivo, lo cual fue confirmado post mórtem. Asimismo, en ocho ratas diabéticas se detectó la presencia de cataratas, acompañada por una aparente pérdida de capacidad visual, al final del estudio (**Figura 9**).

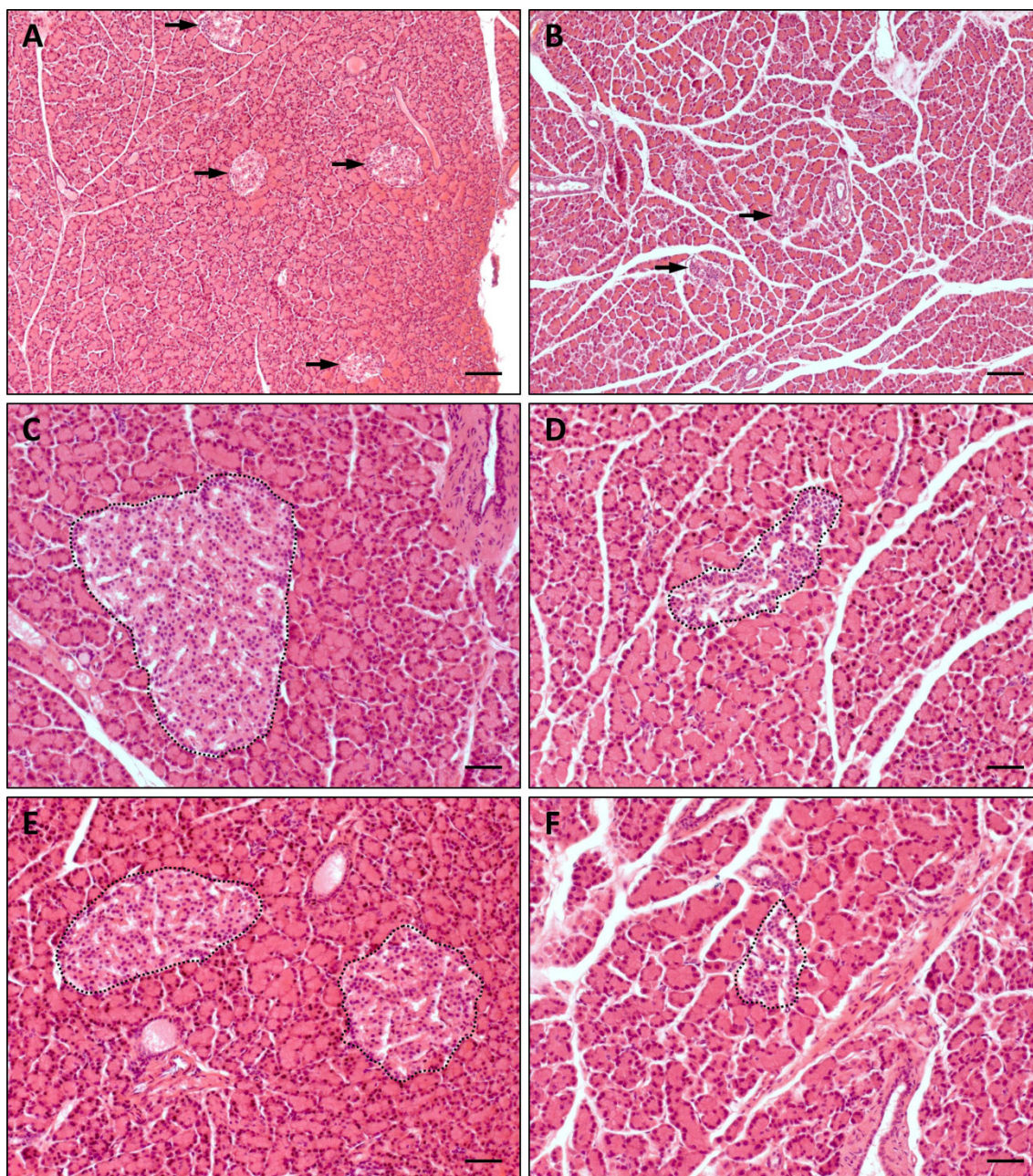


**Figura 9:** **A)** Tiras reactivas tras su contacto con orina de ratas diabéticas (izq.) y sanas (dcha.). El viraje hacia verde indica una alta presencia de glucosa en orina. **B)** Diferencias entre los pesos de las ratas sanas y diabéticas tras la inducción de la patología, expresados como ratio del peso en el momento de la intervención quirúrgica frente al peso inicial. **C)** Presencia de cataratas oculares en animales diabéticos.

De manera adicional, se llevó a cabo un estudio histopatológico del páncreas tras la eutanasia de los animales para comprobar el efecto de la estreptozotocina sobre este órgano. Este análisis reveló una clara alteración del páncreas en los animales de los grupos diabéticos. En comparación con las muestras procedentes de animales sanos, los páncreas diabéticos mostraron diferencias en cuanto a la morfología y distribución



de los islotes de Langerhans. El tamaño de estos fue marcadamente menor, con una forma irregular y parcialmente degenerada, en contraste con los perfiles más globulares de los animales sanos. Además, en estos últimos la presencia de los islotes a lo largo del parénquima pancreático fue claramente mayor (**Figura 10**).



**Figura 10:** Aspecto y distribución de los islotes de Langerhans (flechas y líneas de puntos) en muestras de páncreas procedentes de ratas sanas (**A, C, E**) y diabéticas (**B, D, F**). Estos últimos presentaron una menor cantidad de islotes, de tamaño más pequeño y forma irregular que los sanos. HE, barra: 100  $\mu\text{m}$  (**A, B**); 50  $\mu\text{m}$  (**C, D, E, F**).

### 3.2.4 Procedimiento quirúrgico

Para estudiar los procesos de cicatrización cutánea se realizó en todos los animales un defecto excisional circular de grosor total, con un diámetro de 1,5 cm. Todos los procedimientos quirúrgicos fueron llevados a cabo en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá, y se encuentran ilustrados en la **Figura 11**.

Previamente a la realización del defecto, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (Imalgene® 1000, Merial-Sanofi) y xilacina (Rompún®, Bayer), a una dosis de 150 mg/kg y 2 mg/kg, respectivamente, mediante inyección intraperitoneal. Una vez anestesiados, se rasuró una amplia zona del dorso de los animales empleando una rasuradora eléctrica, y la piel expuesta fue desinfectada con etanol al 70%.

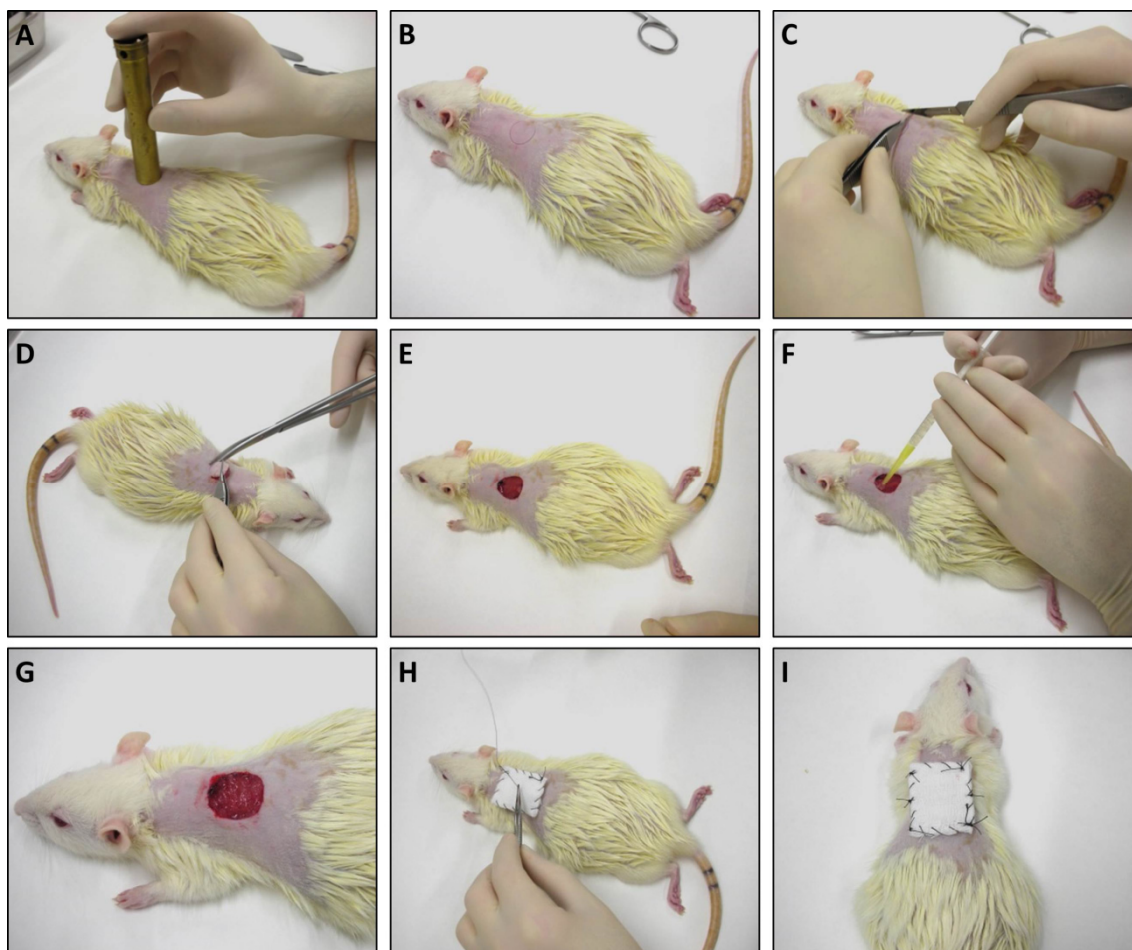
El defecto cutáneo fue realizado en la zona dorsal de las ratas, en posición centrada, situando el bode superior aproximadamente 0,5 cm bajo las escápulas. Para ello, la zona a extirpar fue marcada utilizando un cilindro metálico (*“punch”*) de 1,5 cm de diámetro, realizando un movimiento de rotación acompañado de presión. La piel fue retirada con la ayuda de bisturí y tijeras quirúrgicas, siguiendo la línea previamente marcada. El defecto realizado afectó a todas las capas de la piel, así como al tejido subcutáneo subyacente.

Una vez realizada la lesión, a los animales pertenecientes a los grupos PCLB, HEP y BEM les fue administrado el hidrogel correspondiente. Este fue aplicado sobre la herida utilizando las jeringuillas previamente cargadas a las que les fue acoplada una boquilla de un 1 mm de diámetro, de manera que cubriera completamente la superficie. El volumen de gel aplicado en todos los casos fue de 0,8 mL.

Con objeto de impedir una posible caída del hidrogel administrado y/o manipulación de la herida por parte del animal, se colocaron en todos los grupos dispositivos cobertores sobre los defectos. Estos dispositivos fueron diseñados de manera que supusieran una protección acolchada para la herida, a la vez que no interaccionaran con el hidrogel subyacente (en los grupos PCLB, HEP y BEM). Para ello, se fabricaron cobertores rectangulares de 38 mm de largo por 31 mm de ancho compuestos por



gasa de algodón unida a una lámina de film de laboratorio (Parafilm M®, Pechiney Plastic Packaging) mediante sutura continua de seda (Assusilk 3/0, Assut Europe). Tras su esterilización, los dispositivos fueron inmovilizados sobre el dorso de los animales cubriendo los defectos mediante seis puntos de sutura de seda (Assusilk 3/0, Assut Europe) situados en las cuatro esquinas y los dos puntos medios de los lados longitudinales, evitando su interferencia con la zona de la herida. Dos días después de la intervención, los cobertores fueron retirados cortando los puntos.



**Figura 11:** Procedimiento quirúrgico. **A, B, C, D, E)** Realización del defecto excisional. **F, G)** Aplicación del hidrogel sobre el defecto. **H, I)** Sutura del cobertor.

### **3.2.5 Sacrificio y recogida de muestras**

Una vez alcanzado el tiempo de estudio correspondiente a cada animal, estos fueron anestesiados y se extrajo una muestra sanguínea por punción cardíaca para su empleo en estudios serológicos. Tras ello, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, se extirpó el tejido cicatrizal y se dividió longitudinalmente en dos mitades, destinándose la parte izquierda para estudios microscópicos y derecha para estudios expresión génica. Asimismo, se tomaron muestras pancreáticas para la evaluación de la diabetes provocada experimentalmente.

## **3.3 ESTUDIOS MORFOMÉTRICOS**

Durante toda la duración del estudio los animales se mantuvieron bajo observación para evaluar y constatar la evolución tanto de la patología diabética como de la cicatrización cutánea.

### **3.3.1 Evolución del peso de los animales**

Desde el comienzo del estudio, se llevó a cabo un control del peso de los animales, empleando una báscula de mesa (AND EK-3000i, A&D Instruments). Se tomaron medidas de todos los animales previa inducción de la diabetes (en su caso), en el momento de la realización del defecto y en el momento del sacrificio. De manera adicional, se registró el peso de los animales de los grupos de 14d y 21d semanalmente (a 7 días, y 7 y 14 días, respectivamente).

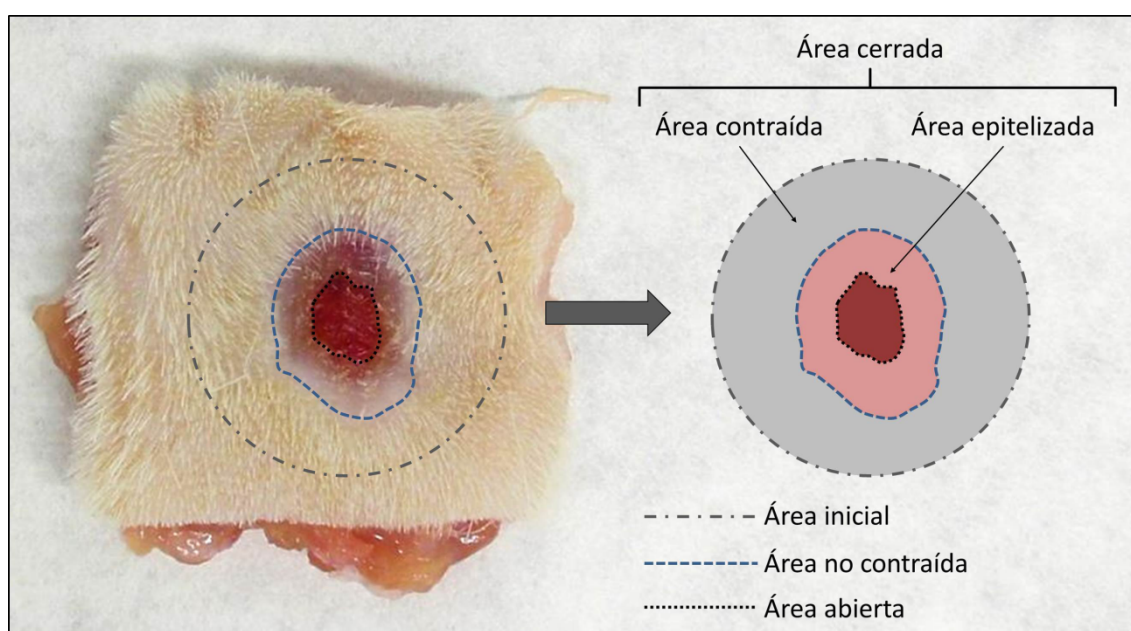
### **3.3.2 Análisis morfométrico de la evolución del defecto**

Para evaluar macroscópicamente el proceso de cierre de la herida se tomaron fotografías tras la realización del defecto y en el momento del sacrificio. Para ello, se utilizó una cámara fotográfica digital compacta (COOLPIX S6, Nikon) anclada a un soporte horizontal de altura regulable. Se realizaron fotografías cenitales de los



defectos en los animales, así como del tejido cicatrizal extirpado, acompañados de una regla para permitir su posterior escalado.

Las fotografías fueron procesadas utilizando software de tratamiento de imágenes (ImageJ, U.S. National Institutes of Health), midiéndose el área inicial de la lesión, así como el área del defecto sin cerrar y el área de contracción de la herida en el momento del sacrificio. Con estos datos, se calcularon los valores relativos a los procesos de contracción, epitelización y cierre de la herida (**Figura 12**).



**Figura 12:** Análisis morfológico de la zona del defecto. A partir de fotografías digitales tomadas al realizar el defecto y tras el sacrificio de los animales, se realizaron medidas mediante software de tratamiento de imagen de las áreas iniciales, no contraídas y abiertas de cada individuo. Con estos valores, se calcularon las áreas cubiertas por los procesos de epitelización (área no contraída – área abierta) y contracción (área inicial – área no contraída), así como su contribución relativa al cierre de la herida, expresándolo como porcentaje sobre el área inicial del defecto.

### 3.4 ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

#### 3.4.1 Procedimientos histológicos y tinciones

##### Fijación, inclusión en parafina y corte de las muestras

Inmediatamente después de su obtención, las muestras destinadas a microscopía óptica fueron fijadas por inmersión en solución F-13, cuya composición se detalla a continuación:

- Etanol (Panreac) ..... 60%
- Metanol (Panreac) ..... 20%
- Polietilenglicol 300 PS (Panreac) ..... 7%
- Agua destilada ..... 13%

Transcurrido el tiempo necesario para su correcta fijación, las muestras fueron deshidratadas e incluidas en parafina según el siguiente protocolo:

- Agua destilada ..... 20 minutos
- Etanol 70% ..... 20 minutos
- Etanol 96% ..... 30 minutos
- Etanol 100% ..... 3x20 minutos
- Etanol 100%/Acetato n-butilo (1:1) ..... 15 minutos
- Acetato n-butilo (Panreac) ..... 2x10 minutos
- Acetato n-butilo/Parafina (1:1) ..... 20 minutos
- Parafina (Merck) ..... 5 horas

Los dos últimos pasos, en los que se emplea parafina, fueron realizados dentro de una estufa a 60 °C. Tras la inclusión, se confeccionaron los bloques de parafina empleando moldes, orientando el plano sagital (mediano) de la muestra hacia la superficie de corte. Se obtuvieron secciones de 5 µm de espesor utilizando un microtomo de rotación (HM 350 S, MICROM) que fueron recogidos en portaobjetos de vidrio impregnados con una solución de polilisina al 0,01% para facilitar su adhesión. Una vez secas, las secciones fueron desparafinadas durante 30 minutos en xilol (Panreac), y posteriormente rehidratadas empleando una batería de alcoholes de concentraciones decrecientes: etanol 100% (10 minutos), etanol 96% (10 minutos), etanol 70% (10

minutos), y finalmente agua. Tras la rehidratación, los cortes fueron sometidos a las distintas tinciones y técnicas inmunohistológicas descritas más adelante.

### Tinciones

A continuación se describen los protocolos de las tinciones histológicas realizadas y su resultado y utilidad en el estudio.

#### **Hematoxilina-Eosina (HE)**

- Tinción con hematoxilina de Carazzi durante 20 minutos.
- Lavado con agua corriente durante 10 minutos para el viraje de la hematoxilina.
- Tinción con eosina alcohólica durante 3 minutos.
- Lavado de los cortes en agua.
- Deshidratación en etanol al 96% durante 5 minutos.
- Deshidratación en etanol al 100% durante 5 minutos.
- Aclaramiento en xilol durante 10 minutos.
- Montaje con Cytoseal™ (Thermo Scientific).

Permite observar la morfología general del tejido, su organización y celularidad, así como el grado de inflamación tisular.

#### **Tricrómico de Masson, variante de Goldner-Gabe (TM)**

- Tinción con hematoxilina de Carazzi durante 20 minutos.
- Lavado con agua corriente durante 10 minutos.
- Tinción con fucsina durante 10 minutos.
- Lavado rápido en agua acética al 1%.
- Tinción con orange G durante 10 minutos.
- Lavado rápido en agua acética al 1%.
- Tinción con verde luz durante 10 minutos.
- Lavado con agua con unas gotas de alcohol al 96%.
- Deshidratación en alcohol al 96% durante 2 minutos.
- Deshidratación en alcohol al 100% durante 5 minutos.
- Aclaramiento en xilol durante 10 minutos.

- Montaje con Cytoseal™.

Esta tinción proporciona un color verde-azulado a la matriz extracelular, permitiendo analizar su organización y evolución durante el proceso reparativo.

#### **Rojo Sirio (RS)**

- Tinción con rojo sirio en saturación de ácido pícrico durante 30 minutos.
- Lavado con agua corriente.
- Deshidratación rápida en alcohol al 100%.
- Aclaramiento de los cortes en xilol.
- Montaje con Cytoseal™.

Esta técnica permite distinguir entre el colágeno inmaduro, que aparece en tonos amarillentos, y el colágeno maduro, en tonos rojizos, cuando se realiza la observación en campo oscuro, así como la organización y alineamiento de las fibras.

#### **Azul de toluidina (AT)**

- Tinción con azul de toluidina (0,1%, pH 2,3) durante 3 minutos.
- Lavado con agua destilada, tres cambios.
- Deshidratación rápida en etanol al 96% y dos cambios en etanol al 100%.
- Aclaramiento con xilol, dos cambios de 3 minutos.
- Montaje con Cytoseal™.

Esta tinción permite la observación clara de los mastocitos, cuyos gránulos citoplasmáticos adquieren un color púrpura/morado (tinción metacromática), destacando sobre la coloración de fondo azul (tinción ortocromática).

### **3.4.2 Valoración histológica**

La observación de las preparaciones se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico Zeiss Axiophot equipado con una cámara digital AxioCam HRc (Carl Zeiss). Para cada tinción, se analizaron tres secciones correspondientes a la zona media de la herida y tres secciones correspondientes a una zona más periférica.

Se realizó una valoración histológica del proceso de cicatrización de todas las muestras cutáneas, prestando especial atención a los siguientes parámetros:

- Activación y evolución de los bordes de la herida.
- Formación de tejido de granulación, síntesis de nueva matriz y organización de la misma.
- Presencia y distribución de células inflamatorias.
- Vascularización del tejido neoformado.
- Epitelización de la zona del defecto.
- Contracción de la herida y aproximación de bordes.

Con estos datos, se realizó una valoración global de los grupos y se compararon entre ellos para cada tiempo de estudio. Asimismo, se realizaron montajes fotográficos panorámicos de las muestras más representativas de cada grupo, utilizando el software de tratamiento de imagen Adobe Photoshop® CS 8 (Adobe Systems).

A partir de la tinción con azul de toluidina, se llevó a cabo una valoración cualitativa y semicuantitativa de la presencia de mastocitos en los bordes de la herida y en el tejido de granulación neoformado, atendiendo a su número, distribución y estado de degranulación.

Las muestras pancreáticas fueron evaluadas microscópicamente, teniendo en cuenta la presencia, frecuencia, tamaño y aspecto de los islotes de Langerhans.

### **3.4.3 Análisis micromorfométrico del tejido cicatrizal**

La formación de nuevo tejido durante la cicatrización fue analizada microscópicamente sobre las preparaciones histológicas empleando el software Zeiss AxioVision. Se realizaron medidas en distintos puntos de los grosores de la epidermis y la dermis de los bordes del defecto (cuatro medidas por sección), así como del tejido de granulación y la neoepidermis (tres medidas por sección), obteniéndose los valores medios para cada animal. Los resultados se expresaron como la fracción de los grosores de tejido neoformado entre tejido marginal (neodermis/dermis y neoepidermis/epidermis, respectivamente).

### 3.5 ESTUDIOS INMUNOHISTOLÓGICOS

Se llevaron a cabo estudios inmunohistológicos para evaluar la presencia y distribución en el tejido cicatrizal de miofibroblastos y vasos sanguíneos, así como de macrófagos y sus subpoblaciones (fenotipo M2).

#### 3.5.1 Protocolos inmunohistológicos

Las muestras destinadas a estudios inmunohistológicos fueron procesadas como se ha descrito previamente. Tras su corte, desparafinado y rehidratación, las secciones fueron sometidas a distintos protocolos, descritos a continuación. En todos los casos, se utilizaron secciones del mismo tejido como control negativo, en las cuales la incubación con anticuerpo primario fue sustituida por incubación en solución de bloqueo.

##### *Inmunohistoquímica (fosfatasa alcalina)*

La detección inmunohistoquímica de los antígenos de interés se realizó por el método ABC (complejo avidina-biotina), empleando fosfatasa alcalina como trazador, siguiendo el protocolo siguiente:

- Lavado y equilibrado de las muestras en PBS, tres pases de 5 minutos.
- Bloqueo de zonas de unión inespecífica; incubación durante 45 minutos a temperatura ambiente en solución de bloqueo: 10% FBS (suero fetal bovino), 1% BSA (albúmina de suero bovino), 0,05% Tween® 20 en PBS.
- Incubación con el anticuerpo primario, toda la noche a 4 °C. Dilución según anticuerpo (ver **Tabla 2**) en solución de bloqueo.
- Lavado en PBS, un pase rápido más tres pases de 5 minutos.
- Incubación con el anticuerpo secundario unido a biotina durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Dilución según anticuerpo (ver **Tabla 3**) en PBS.
- Lavado en PBS, un pase rápido más tres pases de 5 minutos.

- Incubación con el conjugado avidina-fosfatasa alcalina (ExtrAvidin®-Alkaline Phosphatase, Sigma-Aldrich) durante 1 hora a temperatura ambiente. Dilución 1/200 en PBS.
- Lavado en PBS, un pase rápido más tres pases de 5 minutos.
- Revelado con el sustrato cromogénico, controlando la aparición de marcaje bajo el microscopio. El sustrato se prepara inmediatamente antes del revelado, añadiendo secuencialmente a 10 mL de tampón PBS:
  - 10 mg de naftol AS-BI fosfato
  - 10 mg de Fast Red
  - 100 µL de clorhidrato de tetramisol 0,1 M

Una vez mezclado, la solución obtenida se filtra y se aplica sobre el tejido, obteniéndose un marcaje rojo intenso.

- Lavado en agua, un pase rápido más otro de 5 minutos.
- Contrastado de los núcleos con hematoxilina de Carazzi durante 7 minutos.
- Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
- Montaje en medio acuoso con plasdona.

#### Inmunohistofluorescencia doble

Para la colocación de marcadores panmacrofágico y de fenotipo M2, se llevó a cabo una técnica de inmunofluorescencia doble, según el protocolo siguiente:

- Lavado y equilibrado de las muestras en PBS, tres pases de 5 minutos.
- Bloqueo de zonas de unión inespecífica; incubación durante 45 minutos a temperatura ambiente en solución de bloqueo: 10% FBS (suero fetal bovino), 1% BSA (albúmina de suero bovino), 0,05% Tween® 20 en PBS.
- Incubación con mezcla de anticuerpos primarios durante 2 horas a 37 °C. Dilución según anticuerpo (**Tabla 2**) en solución de bloqueo.
- Lavado en PBS, un pase rápido más tres pases de 5 minutos.
- Incubación con mezcla de anticuerpos secundarios unidos a fluoróforos durante 1 hora y 30 minutos a 37 °C (oscuridad). Dilución según anticuerpo (**Tabla 3**) en PBS-Tween® 20 al 0,05%.
- Lavado en PBS, un pase rápido más tres pases de 5 minutos.

- Contrastado de los núcleos con DAPI (Merck Millipore) durante 5 minutos a temperatura ambiente (oscuridad). Concentración de 1 µg/mL en PBS.
- Lavado en PBS, dos pases de 5 minutos.
- Enmascaramiento de la autofluorescencia; incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente (oscuridad) en Sudan Black B (Sigma-Aldrich) al 0,1% en etanol al 70%.
- Lavado en PBS, dos pases de 5 minutos más un pase en agua.
- Montaje con Fluoromount-G® (SouthernBiotech).

### 3.5.2 Anticuerpos empleados

Para la realización de las técnicas inmunohistológicas se emplearon los anticuerpos descritos en las **Tabla 2** y **Tabla 3**.

| Antígeno     | Especificidad                             | Especie | Clon       | Dilución | Proveedor  |
|--------------|---|---------|------------|----------|------------|
| <b>αSMA</b>  | Miofibroblastos, células musculares lisas | Ratón   | 1A4        | 1/400    | Sigma      |
| <b>CD68</b>  | Macrófagos, monocitos                     | Ratón   | ED1        | 1/200    | AbDSerotec |
| <b>CD206</b> | Macrófagos M2, diversas células cutáneas  | Conejo  | Policlonal | 1/200    | Abcam      |

**Tabla 2:** Anticuerpos primarios empleados.

| Antígeno            | Conjugación      | Especie | Clon       | Dilución | Proveedor  |
|---------------------|------------------|---------|------------|----------|------------|
| <b>IgG (ratón)</b>  | Biotina          | Cabra   | Policlonal | 1/300    | Sigma      |
| <b>IgG (conejo)</b> | Biotina          | Ratón   | RG-96      | 1/1000   | Sigma      |
| <b>IgG (ratón)</b>  | Rhodamine Red™-X | Burro   | Policlonal | 1/300    | Jackson IR |
| <b>IgG (conejo)</b> | Alexa Fluor® 488 | Burro   | Policlonal | 1/1000   | Abcam      |

**Tabla 3:** Anticuerpos secundarios empleados.



### 3.5.3 Evaluación y análisis de las muestras

Las muestras sometidas a la inmunodetección de  $\alpha$ SMA fueron empleadas para llevar a cabo dos análisis. En primer lugar, se valoró la respuesta miofibroblástica en el tejido de granulación, valorando la presencia y densidad de este tipo celular, así como su organización, alineamiento y distribución en el tejido. Adicionalmente, se realizaron recuentos de secciones vasculares marcadas en el tejido de granulación, analizándose cinco campos aleatorios a 200 aumentos en cada preparación.

El análisis de los macrófagos y sus subpoblaciones se llevó a cabo mediante detección inmunohistoquímica de CD68, así como realizando una inmunofluorescencia doble contra CD68 y CD206. Las muestras fueron evaluadas teniendo en cuenta la presencia, cantidad y distribución de los macrófagos en el tejido de granulación. Para su cuantificación y la de sus subpoblaciones, se realizaron recuentos en cinco campos aleatorios a 400 aumentos en cada preparación, obteniéndose el número total de macrófagos (células CD68<sup>+</sup>), macrófagos M2 (células CD68<sup>+</sup>, CD206<sup>+</sup>) y macrófagos no-M2 (células CD68<sup>+</sup>, CD206<sup>-</sup>), y calculándose el porcentaje de macrófagos M2 frente al total.

## 3.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

### 3.6.1 Extracción de RNA

Inmediatamente después de su obtención, las muestras cutáneas destinadas a los estudios de expresión génica fueron congeladas y mantenidas a -80 °C hasta el momento de su utilización. Para la extracción de RNA se emplearon fragmentos de aproximadamente 0,04 cm<sup>3</sup> en forma de sectores circulares.

La extracción de RNA se llevó a cabo mediante el método del isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo de Chomczynski y Sacchi (1987). Para ello, las muestras de tejido se fragmentaron utilizando dos bisturíes sobre placas Petri en un recipiente con hielo, tras lo que se llevaron a un tubo Eppendorf estéril que contenía 1 mL de TRIzol® (Invitrogen-Life Technologies). El tejido se homogeneizó con ayuda de un émbolo estéril, y fue posteriormente centrifugado (12000 g, 4 °C, 10 min), descartando el

precipitado. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, manteniéndose a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se mezcló por agitación durante 5 minutos, obteniéndose una emulsión de color rosa intenso, la cual fue centrifugada (14000 g, 4 °C, 15 min), provocando la separación de fases: fase acuosa transparente (superior) y fase orgánica rosada (inferior), separadas por una interfase blanquecina. La fase acuosa fue trasvasada a un nuevo tubo, añadiendo después 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío. Tras su agitación, se dejó precipitar a 4 °C durante toda la noche.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron (12000 g, 4 °C, 20 min) y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante se resuspendió en 1 mL de etanol al 70% frío, tras lo cual el tubo fue nuevamente centrifugado (12000 g, 4 °C, 15 min). El precipitado obtenido fue lavado una vez más con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y centrifugado (12000 g, 4 °C, 15 min), tras lo que retiró todo el sobrenadante y se dejaron los tubos abiertos a temperatura ambiente para permitir la total evaporación del alcohol. Una vez secos, los pellet se rehidrataron con 25-30  $\mu\text{L}$  de agua libre de DNasas y RNasas (Invitrogen-Life Technologies).

La cuantificación de la concentración de RNA en las muestras se llevó a cabo empleando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Tras realizar un espectro de absorbancia, se calculó la cantidad de RNA en cada muestra a partir de los datos de absorbancia a 260 nm, y se valoró su pureza analizando las relaciones entre las absorbancias a 260/280 y 260/230. Una vez conocida la concentración de las muestras, se realizó una dilución de cada una de ellas a 50 ng/ $\mu\text{L}$ .

### **3.6.2 Transcripción inversa**

El cDNA fue sintetizado a partir de 300 ng de RNA total mediante transcripción inversa. Para ello, se mezclaron 6  $\mu\text{L}$  de RNA (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) de cada muestra con 6  $\mu\text{L}$  de una solución de oligo-dT(15) 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Invitrogen-Life Technologies) y se incubaron a 65 °C durante 10 minutos en un baño seco (AccuBlock™, Labnet International Inc.). Tras

esto, se añadieron 15  $\mu$ L a cada tubo de la mezcla de reacción, cuyo contenido se detalla a continuación:

- First Strand Buffer 5x (Invitrogen-Life Technologies) ..... 4,2  $\mu$ L  
[Tris-HCl 250 mM (pH 8,3); KCl 375 mM; MgCl<sub>2</sub> 15 mM]
- dNTPs 10 mM (Invitrogen-Life Technologies) ..... 3  $\mu$ L
- Ditiotritol 0,1 M (Invitrogen-Life Technologies) ..... 3  $\mu$ L
- Agua libre de DNAsas y RNAsas (Invitrogen-Life Technologies) ..... 2,55  $\mu$ L
- Inhibidor de RNAsas (RNase OUT™, Invitrogen-Life Technologies) ..... 0,75  $\mu$ L
- Transcriptasa inversa (M-MLV RT, Invitrogen-Life Technologies) ..... 1,5  $\mu$ L

La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo en un termociclador G-Storm GS1 (G-Storm). Las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 1 hora y 15 minutos, para permitir la síntesis de cDNA, tras lo cual se incrementó la temperatura a 70 °C y se mantuvo durante 15 minutos, provocando de esta manera la desnaturalización de la transcriptasa inversa.

Para comprobar la ausencia de contaminación de DNA genómico en las muestras de RNA total, se realizó en paralelo una transcripción inversa negativa, en la que la M-MLV RT fue sustituida por agua.

### 3.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR)

Mediante qPCR, se cuantificó la cantidad de cDNA en cada muestra de los siguientes genes de interés: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, FGF2, VEGF-A, TGF- $\beta$ 1, Col-I y Col-III. Los resultados fueron normalizados usando el gen de expresión constitutiva de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Se diseñaron *de novo* cebadores o primers específicos para todos los genes estudiados utilizando las aplicaciones en línea Primer-BLAST (Ye y cols., 2012) y AutoDimer (Vallone y Butler, 2004). Se seleccionaron aquellos pares de primers que presentaron unas mejores características en cuanto a temperaturas de anillamiento, porcentaje de GC, tamaño del amplicón, presencia intrones y/o uniones exón-exón, ausencia de motivos de secuencia conflictivos y baja probabilidad teórica de dimerización y/o

formación de horquillas, así como ausencia de productos potenciales de amplificación no específicos. Las secuencias de los cebadores utilizados pueden encontrarse en la **Tabla 4**.

| Gen                                | Secuencia (5'→3') |                                 | Tm    | Ciclos | Amplícón |
|------------------------------------|-------------------|---------------------------------|-------|--------|----------|
| <b>GAPDH</b>                       | Fwd               | GCC CAC TAA AGG GCA TCC TG      | 60 °C | 40     | 143 pb   |
|                                    | Rev               | GTC ATA CCA GGA AAT GAG CTT CAC |       |        |          |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>     | Fwd               | GTG ATC GGT CCC AAC AAG G       | 59 °C | 45     | 140 pb   |
|                                    | Rev               | GCT TGG TGG TTT GCT ACG A       |       |        |          |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b>     | Fwd               | GAA AGA CAA CCA GGC CAT CAG     | 60 °C | 45     | 130 pb   |
|                                    | Rev               | TGG GTT GTT CAC CTC GAA CT      |       |        |          |
| <b>IL-6</b>                        | Fwd               | AAG CCA GAG TCA TTC AGA GCA A   | 60 °C | 45     | 103 pb   |
|                                    | Rev               | GCA TTG GAA GTT GGG GTA GGA     |       |        |          |
| <b>IL-10</b>                       | Fwd               | CGA CGC TGT CAT CGA TTT CTC     | 60 °C | 45     | 106 pb   |
|                                    | Rev               | TCA TGG CCT TGT AGA CAC CTT     |       |        |          |
| <b>FGF2</b>                        | Fwd               | CGA CCC ACA CGT CAA ACT AC      | 59 °C | 40     | 159 pb   |
|                                    | Rev               | GAC TCC AGG CGT TCA AAG AAG     |       |        |          |
| <b>VEGF-A</b>                      | Fwd               | ATC TTC AAG CCG TCC TGT GT      | 59 °C | 40     | 114 pb   |
|                                    | Rev               | GAT CCG CAT GAT CTG CAT AGT G   |       |        |          |
| <b>TGF-<math>\beta</math>1</b>     | Fwd               | TGT GGA GCA ACA CGT AGA AC      | 58 °C | 40     | 155 pb   |
|                                    | Rev               | GTA TTC CGT CTC CTT GGT TCA G   |       |        |          |
| <b>Col-I<math>\alpha</math>1</b>   | Fwd               | TGA GCC AGC AGA TTG AGA ACA     | 60 °C | 40     | 109 pb   |
|                                    | Rev               | TAC TCT CCG CTC TTC CAG TCA     |       |        |          |
| <b>Col-III<math>\alpha</math>1</b> | Fwd               | GAT GGG ATC CAA TGA GGG AGA A   | 59 °C | 40     | 86 pb    |
|                                    | Rev               | TGT GTT TAG TGC AGC CAT CCT     |       |        |          |

**Tabla 4:** Cebadores empleados en la qPCR. Se muestra la secuencia de los mismos, la temperatura de unión (Tm) y ciclos de amplificación aplicados, así como el tamaño del amplícón.

La qPCR se llevó a cabo en un equipo StepOnePlus™ System (Applied Biosystems-Life Technologies), empleando el método de curva estándar relativa. Para ello, 5 µL de cada muestra, previamente diluida 1/20 en agua libre de nucleasas, se mezclaron con 10 µL de iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories), 1 µL de cebador directo (*forward primer*), 1 µL de cebador reverso (*reverse primer*) y 3 µL de agua libre de DNasas y RNasas en una placa de 96 pocillos MicroAmp® (Applied Biosystems-Life Technologies), para un volumen total de reacción de 20 µL. Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

- 1- Activación de la enzima: 95 °C, 10 minutos.
- 2- Amplificación y detección durante 40 o 45 ciclos (**Tabla 4**) de:
  - Desnaturalización: 95 °C, 15 segundos.
  - Unión de primers: Temperatura específica (temperatura de fusión,  $T_m$ ) para cada par de cebadores (descritas en **Tabla 4**), 30 segundos.
  - Elongación: 72 °C, 1 minuto.
- 3- Curva de disociación: intervalo desde 60 °C hasta 95 °C, con incrementos de 0,3 °C.

La detección de fluorescencia se realizó al final de cada ciclo de amplificación y en cada paso de la curva de disociación. Los datos obtenidos para cada gen fueron interpolados en una curva estándar confeccionada con diluciones seriadas de una mezcla de las muestras del estudio que fue incluida en cada placa. Los valores de los genes de interés fueron normalizados utilizando el gen de referencia GAPDH. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado, y los resultados obtenidos se expresaron en unidades arbitrarias.

Para comprobar la especificidad de los primers y la obtención de un único producto de PCR, se analizaron las curvas de disociación obtenidas tras la reacción de amplificación y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (SeaKem® GTG™ Agarose, Lonza) en tampón TBE, conteniendo 7 µL de SYBR® Green II RNA Gel Stain (Invitrogen-Life Technologies). Como marcador de peso molecular se utilizaron fragmentos  $\phi$ X174 RF DNA/*Hae* III (Invitrogen-Life Technologies). Para la observación y fotografía de los geles se utilizó un equipo Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad Laboratories).

## 3.7 ESTUDIOS SEROLÓGICOS

### 3.7.1 Obtención de suero sanguíneo

Inmediatamente después de su extracción, las muestras sanguíneas fueron transferidas a tubos de centrifuga cónicos, y se centrifugaron a 1500 g durante 15 minutos. Tras ello, la fase líquida superior, correspondiente al suero sanguíneo, fue recogida en tubos Eppendorf, los cuales fueron conservados a -80 °C hasta su utilización.

### 3.7.2 ELISA

La determinación de las concentraciones de citoquinas en suero sanguíneo se llevó a cabo mediante ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) tipo sándwich. Para ello, se utilizaron kits comerciales específicos para la detección en suero de rata de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 (Invitrogen-Life Technologies). Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, y la absorbancia final se midió utilizando un lector de microplacas iMark™ (Bio-Rad Laboratories).

## 3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados empleando el programa Prism 5 (GraphPad Software). El test utilizado fue el ANOVA, seguido del post-test para comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. En el caso de los análisis estadísticos que solamente comprendieran dos grupos de estudio se aplicó el test-*t* de Student. En aquellas series de datos que no se ajustaran a una distribución gaussiana, se realizó una transformación logarítmica para su normalización. Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Los niveles de significación estadística se establecieron en:  $p \leq 0,05$  (\*);  $p \leq 0,01$  (\*\*);  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

# RESULTADOS





## 4 RESULTADOS

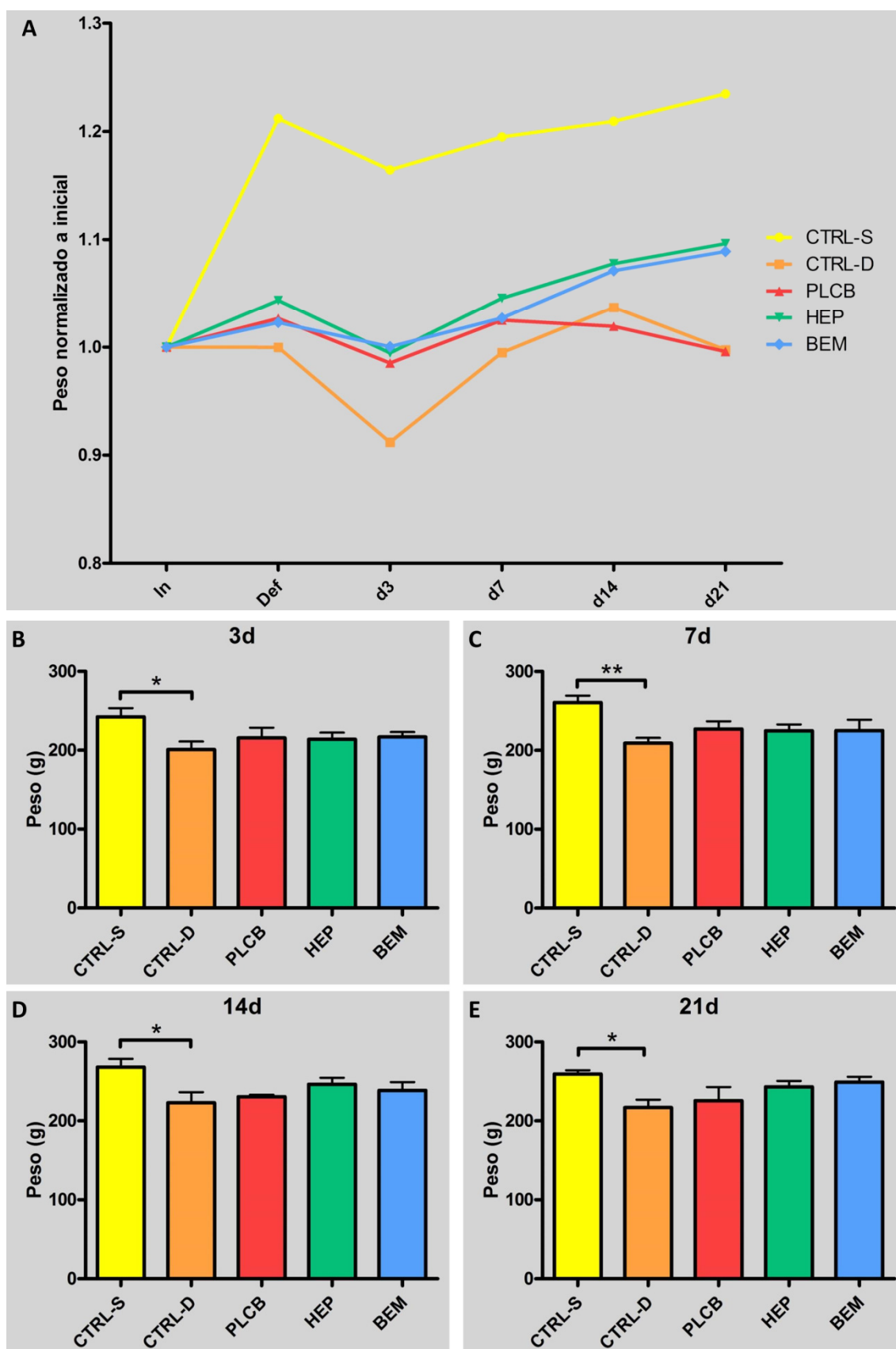
### 4.1 RESULTADOS MACROSCÓPICOS

De los 150 animales empleados, 30 fueron excluidos del estudio debido a las siguientes razones: muerte durante la inducción de anestesia (10 animales), muerte previa a la finalización del tiempo de estudio (7 animales), muerte o sacrificio por severidad de la diabetes (10 animales), autolesión en zona del defecto (2 animales) y ausencia de hiperglucemia tras la inducción de diabetes experimental (1 animal).

#### 4.1.1 Evolución del peso de los animales

El aumento de peso producido durante el periodo comprendido entre la inducción de la diabetes y la realización del defecto fue menor en los grupos de ratas diabéticas en comparación con los animales sanos. Durante este tiempo, las ratas no diabéticas aumentaron su peso con respecto al inicial en un  $21,2\% \pm 1,15\%$ , mientras que las ratas diabéticas mostraron un incremento del  $2,4\% \pm 0,95\%$ .

A los 3 días de realizarse el defecto excisional, los cinco grupos de estudio mostraron una pérdida de peso importante, siendo esta disminución más severa en el caso del grupo CTRL-D. Esta pérdida inicial fue remontada al cabo de una semana de manera similar en todos los grupos. Sin embargo, a partir de este punto, se observó un cambio de tendencia en los grupos CTRL-D y PLCB, en los cuales los pesos observados a tiempos de estudio largos dejaron de aumentar, llegando incluso a mostrar un descenso a día 21. Por el contrario, en los grupos CTRL-S, HEP y BEM, la tendencia hacia la ganancia de peso se mantuvo constante desde el día séptimo hasta el final del estudio, de manera similar en los tres grupos. La evolución gráfica de los pesos puede observarse en la **Figura 13**.

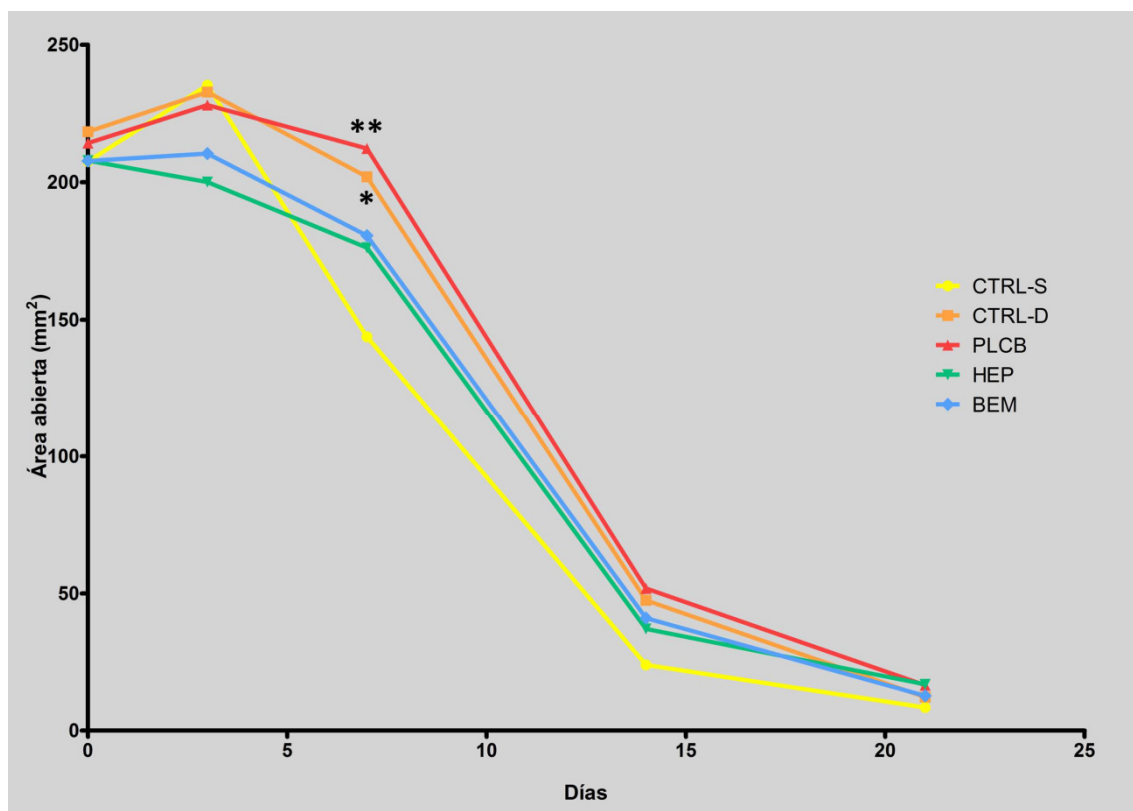


**Figura 13:** Representación gráfica del peso de los animales durante el estudio. **A)** Evolución de los cinco grupos a lo largo del tiempo. Datos expresados como peso normalizado frente al peso inicial. **B, C, D, E)** Peso final de los animales en cada tiempo de estudio. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CTRL-S y CTRL-D en todos los tiempos de estudio.

#### 4.1.2 Análisis morfométrico del defecto

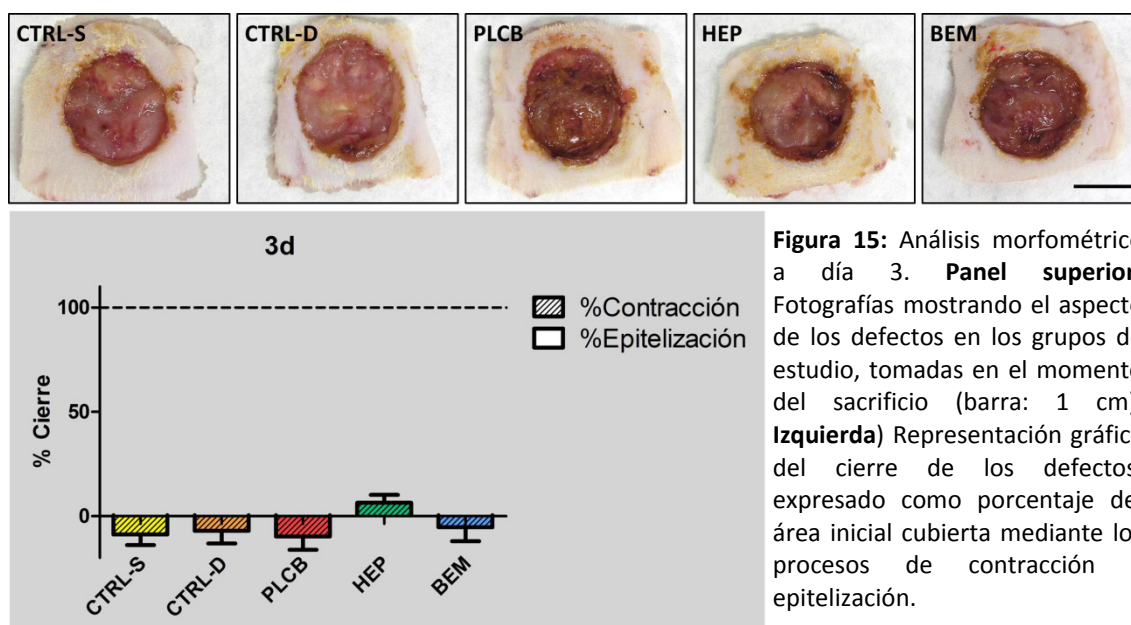
Durante la realización del defecto, la excisión del área circular de diámetro 1,5 cm formó defectos de áreas sensiblemente mayores que la teórica ( $176,7 \text{ mm}^2$ ), con un tamaño medio de  $211,2 \text{ mm}^2$  (SD = 19,1).

La evolución del área del defecto a lo largo del tiempo mostró una distensión a de la herida a día 3, la cual fue menor en los grupos HEP y CTRL-S. La reducción del área abierta ocurrió de manera más rápida en el grupo CTRL-S, mostrando diferencias estadísticamente significativas en su valor medio a 7 días ( $143,8 \text{ mm}^2$ ) frente a CTRL-D ( $202,0 \text{ mm}^2$ ,  $p \leq 0,05$ ) y PLCB ( $212,3 \text{ mm}^2$ ,  $p \leq 0,01$ ). En este tiempo de estudio, los grupos HEP y BEM alcanzaron valores medios ( $176,2 \text{ mm}^2$  y  $180,6 \text{ mm}^2$ , respectivamente) menores que CTRL-D y PLCB, aunque mayores que CTRL-S. En el día 14, estas diferencias fueron más reducidas, sin alcanzar la significatividad estadística. Finalmente, los cinco grupos mostraron valores medios similares a día 21 (**Figura 14**).



**Figura 14:** Evolución del área sin cerrar del defecto a lo largo del tiempo. (\*): CTRL-S vs. CTRL-D, 7d. (\*\*): CTRL-S vs. PLCB, 7d.

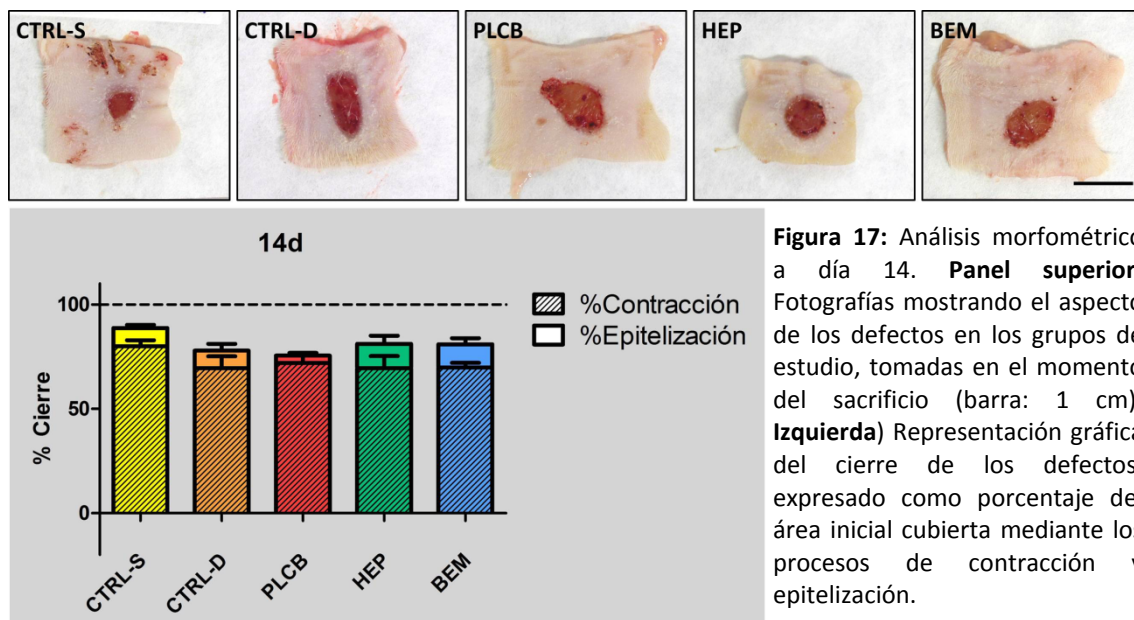
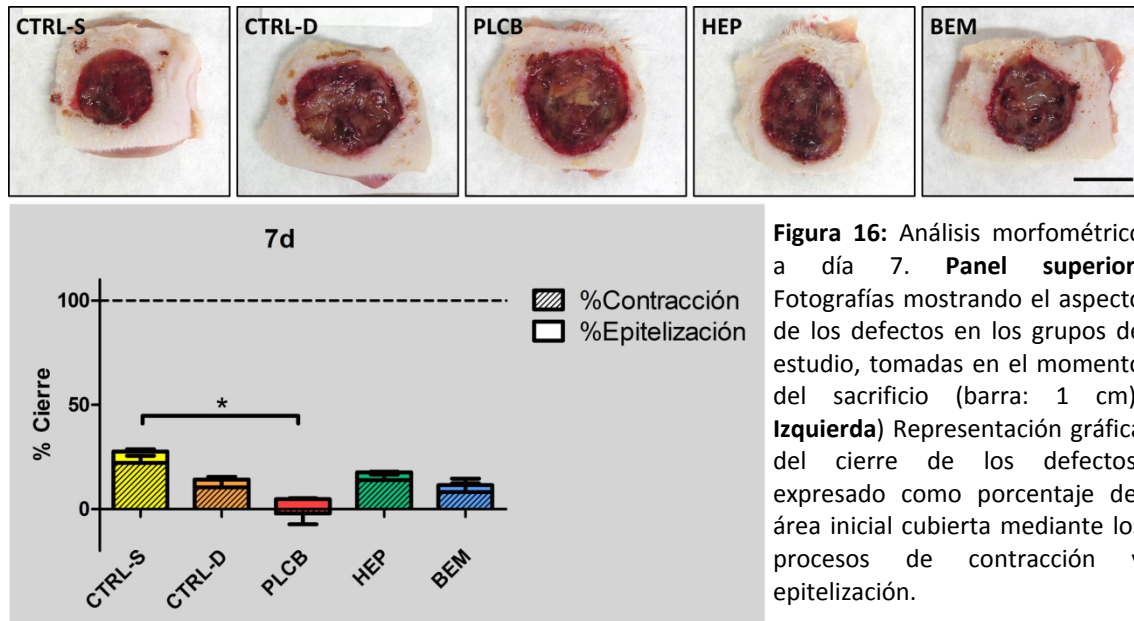
A tiempos cortos (3 días), las heridas mostraron una ligera distensión con respecto a su área original, aunque este fenómeno ocurrió en menor medida en los grupos de hidrogeles con heparinas, los cuales mantuvieron un área de tamaño más similar a la inicial. En este tiempo de estudio, no se observó epitelización en ninguno de los grupos (Figura 15).



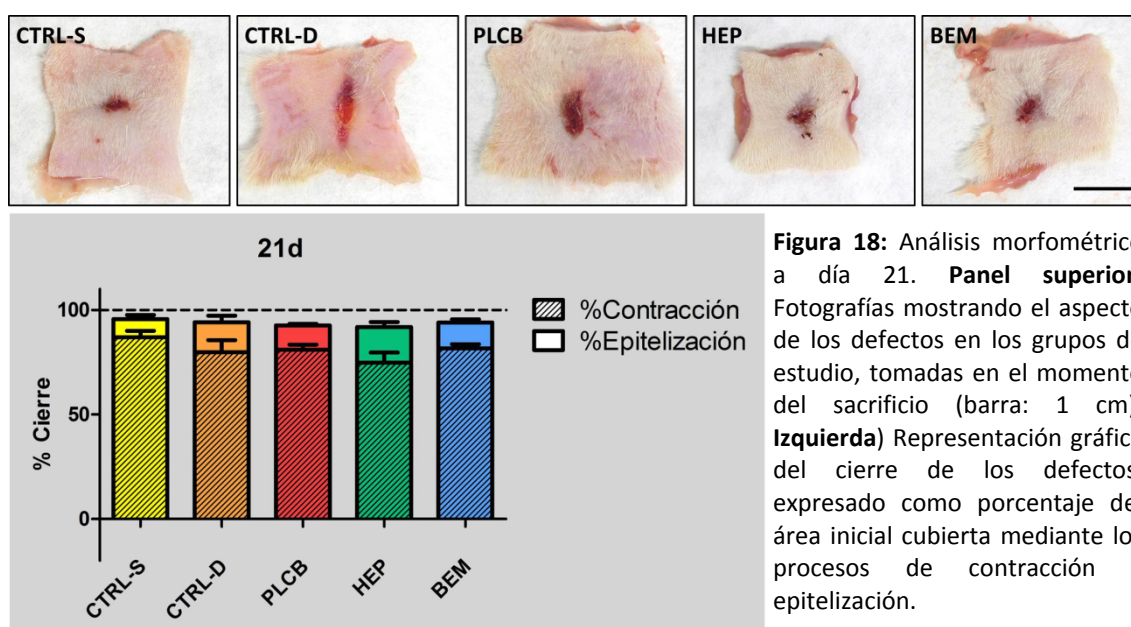
Una semana después de la realización del defecto, los animales sanos mostraron un cierre medio del 27,7% sobre el total, mayor que los de los grupos diabéticos. Pudo observarse en todos los grupos una leve epitelización, aunque a efectos del cierre su contribución fue proporcionalmente mucho menor que el fenómeno de contracción, con valores medios en todos los grupos inferiores al 6% del área inicial cubierta por este proceso (Figura 16).

A los 14 días de la intervención, el grupo sano continuó mostrando un estado más avanzado de cicatrización, aunque las diferencias en el tamaño de la herida frente a los demás grupos fueron menores (CTRL-S: 88,7%; CTRL-D: 77,9%; PLCB: 75,5%; HEP: 81,2%; BEM: 80,9%). En las ratas diabéticas, hubo una contracción similar en los cuatro grupos, entre un 69-71%. Sin embargo, HEP y BEM mostraron una mayor epitelización (11,7% y 11,1%) que CTRL-D y PLCB (8,5% y 3,6%), aunque estas diferencias no

alcanzaron la significatividad estadística. Morfológicamente, las heridas de los grupos CTRL-D y PLCB mostraron una forma ovalada longitudinal, a diferencia de los otros grupos, en los que se observó una tendencia hacia un cierre más circular o transversal (Figura 17).



Al final del estudio (21 días), el área abierta del defecto fue similar en todos los grupos, con valores medios entre 4-8%. En todos los casos, la contribución de la contracción sobre el total del cierre fue proporcionalmente mayor que la aportada por la epitelización, con valores medios globales del 80,8% y el 12,8%, respectivamente. La tendencia hacia un cierre longitudinal observada en CTRL-D y PLCB continuó en este tiempo de estudio; estos grupos mostraron en términos generales cierres ojivales, en contraposición con los grupos HEP y BEM, cuyos defectos sufrieron cierres más centrípetos de manera similar a lo observado en CTRL-S (**Figura 18**).



## 4.2 ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

### 4.2.1 Valoración histológica

#### Estudios a 3 días

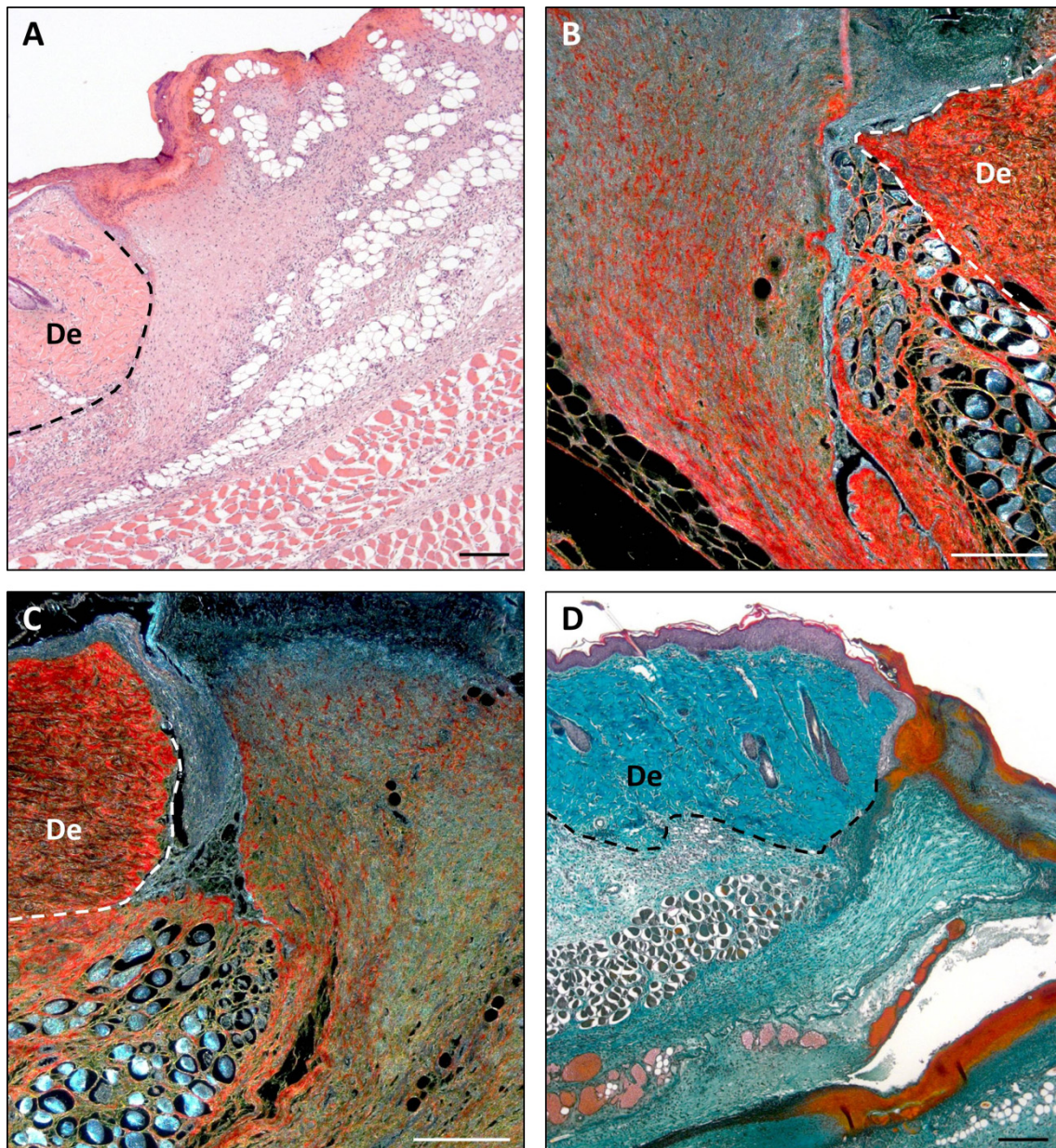
A nivel histológico, el primer tiempo de estudio se caracterizó por la activación de los mecanismos asociados a la respuesta reparativa cutánea. Pudo observarse una clara respuesta inflamatoria, así como el comienzo de la migración y proliferación epitelial, acompañados del inicio de la síntesis de matriz extracelular.



En los extremos del defecto de los animales sanos, se observó una activación inflamatoria de la zona inferior de la dermis y el tejido subcutáneo. El epitelio de los bordes, visiblemente engrosado, pudo verse frecuentemente migrando sobre el extremo dérmico expuesto, actuando a modo de cobertura de los bordes del defecto. El tejido conjuntivo bajo el panículo carnosos mostró un engrosamiento con respecto al de la piel intacta, sirviendo como foco a partir del cual irradiaban células inflamatorias hacia el centro de la herida, así como comenzaba a depositarse nueva matriz provisional, convergiendo con el borde epitelial y completando un “sellado” de los extremos de la herida (**Figura 19A**). La matriz de nueva formación mostró mayoritariamente una composición no colágena, aunque se observó un inicio de colagenización del nuevo tejido en las zonas más inmediatas a los bordes de la herida (**Figura 19B**). Los animales del grupo CTRL-D mostraron una mayor inflamación tisular que los sanos, así como un sellado de los bordes retrasado en el tiempo, con un epitelio más fino, menos matriz neoformada y una presencia de colágeno más baja que el grupo CTRL-S (**Figura 19C, D**). La aplicación de hidrogeles pareció mejorar los estadios iniciales de la cicatrización al compararlos con el grupo diabético control. El sellado de los bordes del grupo PLCB fue ligeramente mejor que el de CTRL-D, mientras que en el caso de HEP y BEM la diferencia fue más pronunciada. En estos grupos, los extremos epiteliales tuvieron un mayor tamaño, frecuentemente en forma de lengua o cuña en contacto con el nuevo tejido, llegando en ocasiones a comenzar la migración sobre la nueva matriz (**Figura 20A, B, C**). Esta a su vez también mostró en términos generales un mayor desarrollo (**Figura 20D, E, F**), pudiendo observarse una proporción de colágeno más elevada en el nuevo tejido, al compararlo con el grupo placebo y con el control diabético.

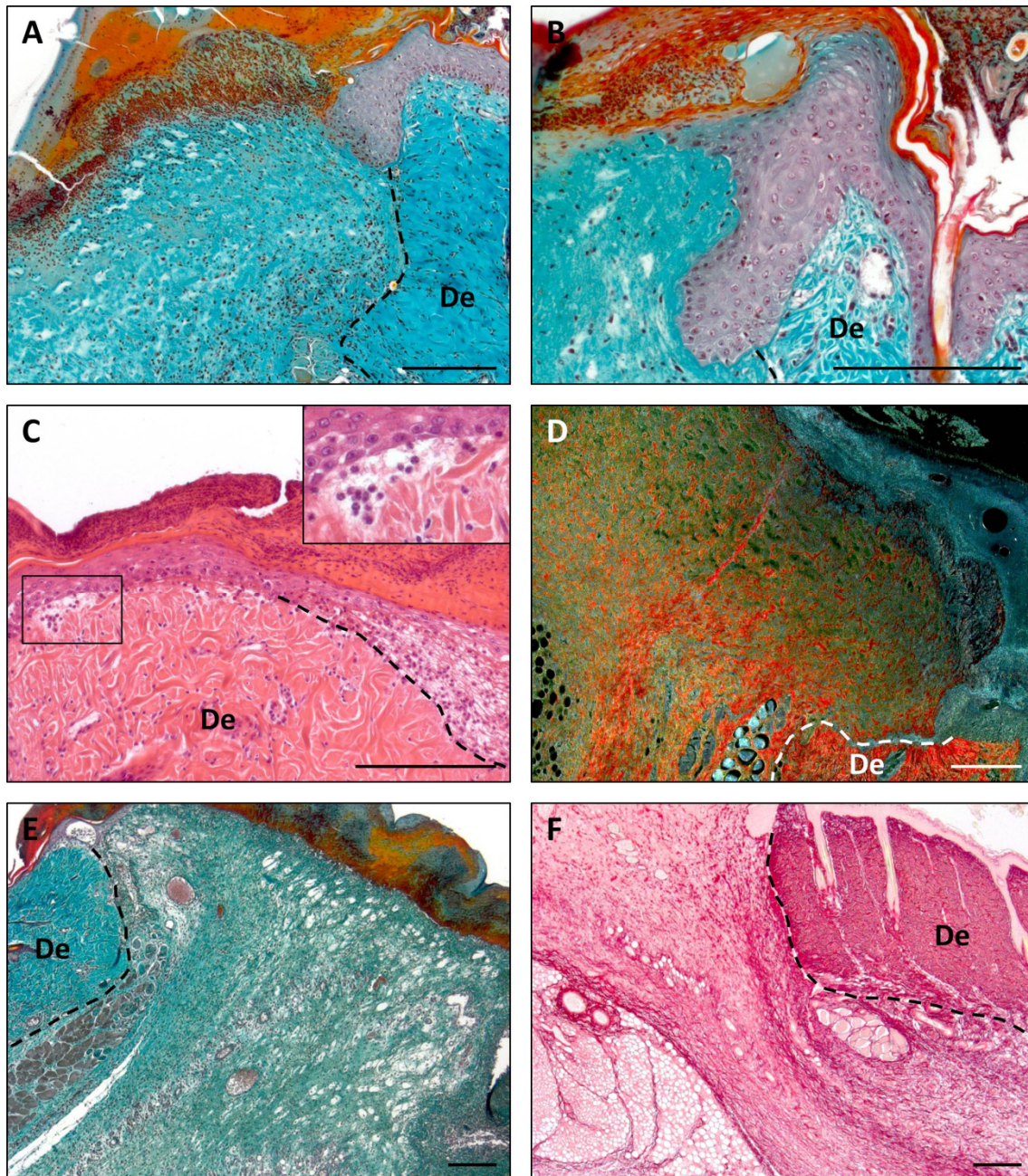
Las zonas centrales de los defectos en el grupo CTRL-S mostraron una importante inflamación tisular, y el tejido más superficial adoptó un aspecto seco, visiblemente deteriorado y cubierto en la superficie por exudado inflamatorio (**Figura 21A**). La inspección a grandes aumentos permitió constatar la presencia mayoritaria de leucocitos polimorfonucleares en el componente inflamatorio, especialmente en el superficial. El tejido expuesto en el centro de la herida del grupo CTRL-D mostró una mayor presencia de células inflamatorias y un tejido más desorganizado (**Figura 21B**).

En los tres grupos tratados con hidrogel (PLCB, HEP y BEM), la zona central de la herida mostró un aspecto menos reseco, y con una elevada respuesta inflamatoria, especialmente asociada a las zonas con restos de hidrogel (**Figura 21C, D**). Los fragmentos en proceso de degradación localizados en el tejido presentaron numerosas células inflamatorias rodeándolos, así como infiltradas en su interior (**Figura 21E, F**).



**Figura 19:** Bordes del defecto a 3 días (I). **A)** Imagen del borde en grupo CTRL-S (HE). **B)** Colagenización en CTRL-S (RS). **C)** Colagenización en CTRL-D (RS). **D)** Imagen del borde en grupo CTRL-D (TM). Se muestra el límite de la dermis intacta (**De**) con líneas discontinuas. Barras: 200  $\mu$ m.

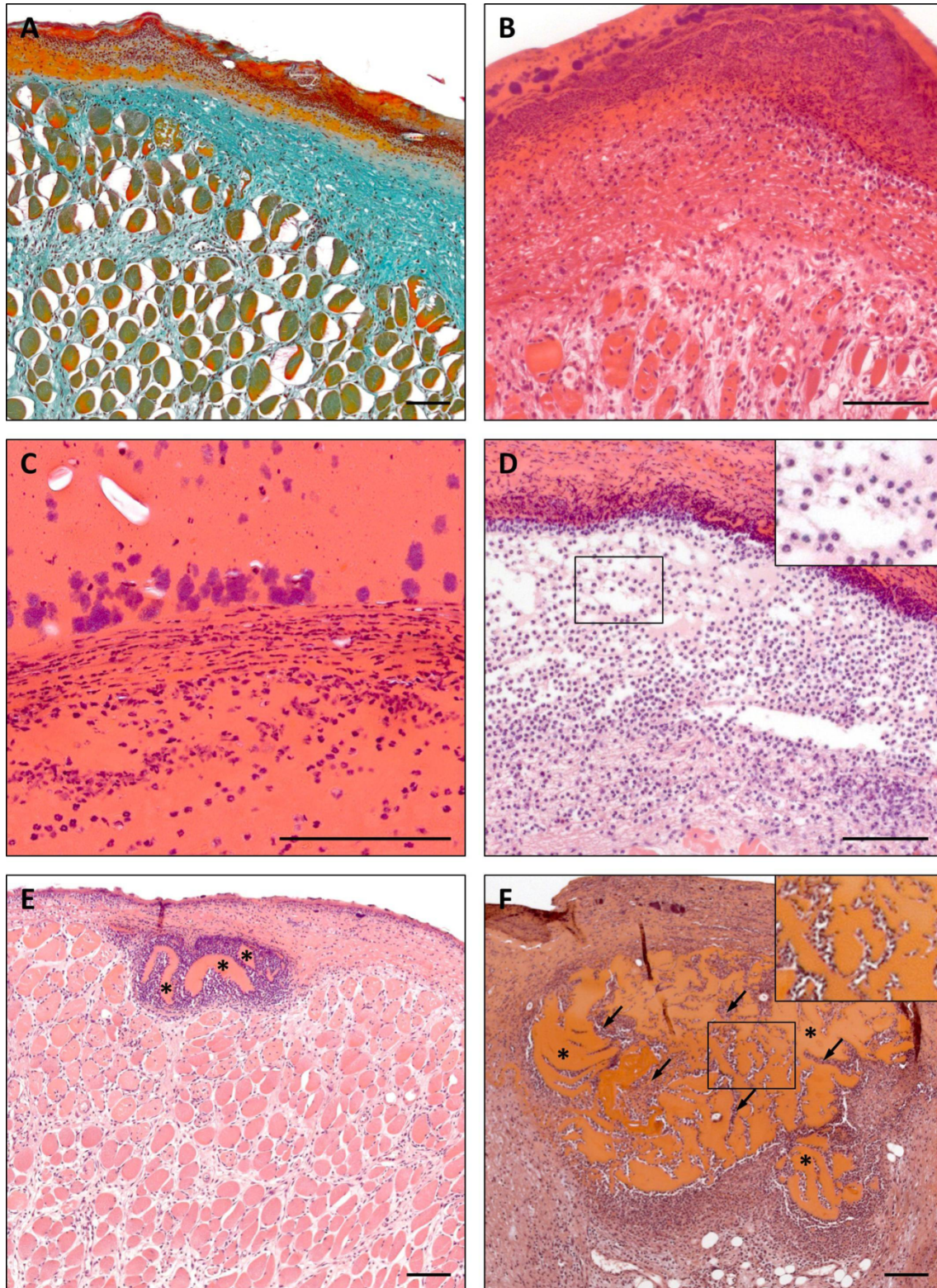




**Figura 20:** Bordes del defecto a 3 días (II). **A)** Cuña epitelial en grupo BEM (TM). **B)** Cuña epitelial en grupo HEP (TM). **C)** Lengua epitelial en grupo BEM y detalle de células inflamatorias bajo el epitelio en migración. (HE). **D)** Presencia de colágeno en grupo BEM (RS). **E)** Aspecto del borde en grupo HEP (TM). **F)** Presencia de colágeno en grupo HEP (RS). Se muestra el límite de la dermis intacta (**De**) con líneas discontinuas. Barras: 200  $\mu$ m.

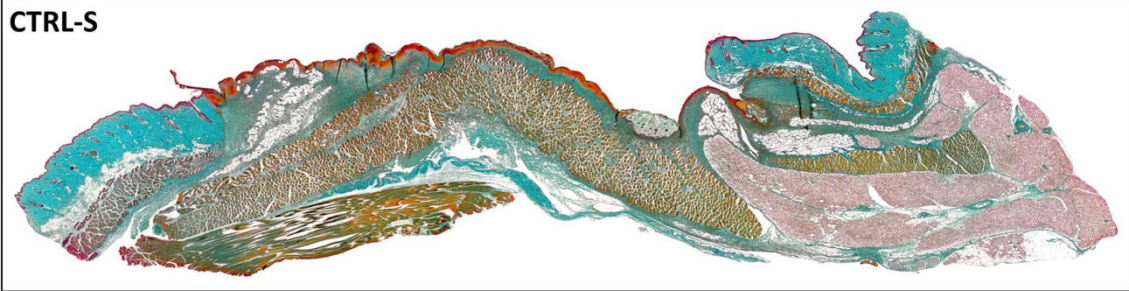
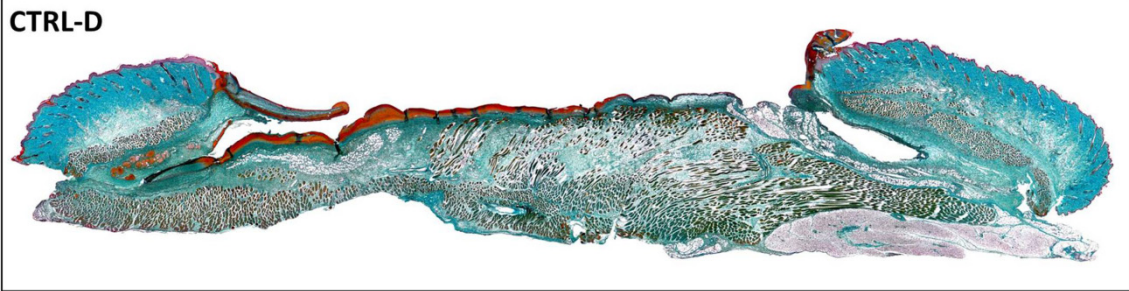
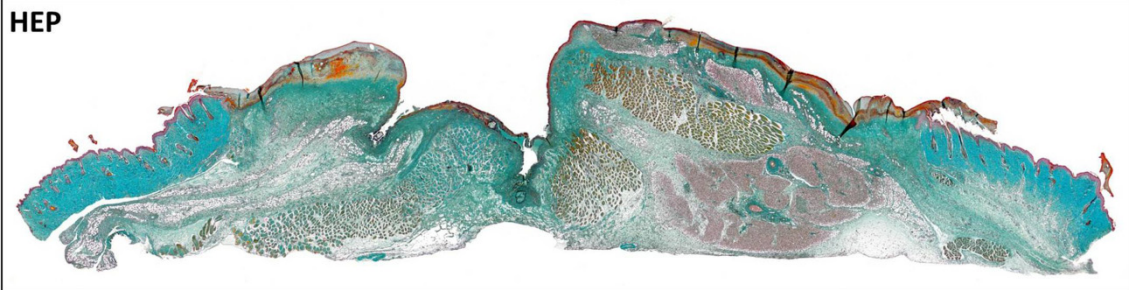
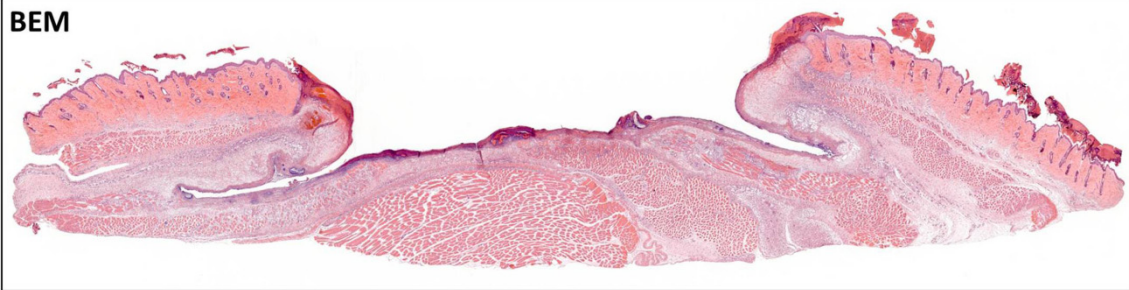
En términos generales, en este tiempo de estudio (3 días), los cuatro grupos diabéticos mostraron una inflamación mayor que el grupo control sano. Los grupos de hidrogeles cargados con heparinas mostraron un mejor comportamiento que el grupo de hidrogel placebo, y este a su vez mejor que CTRL-D (**Figura 22**).





**Figura 21:** Centro de la herida a 3 días. **A)** Imagen de la superficie en grupo CTRL-S (TM). **B)** Imagen de la superficie en grupo CTRL-D (HE). **C)** Exudado inflamatorio bajo el hidrogel en grupo PLCB (HE). **D)** Células inflamatorias en grupo PLCB y detalle de las mismas (HE). **E)** Fragmentos de hidrogel (\*) en grupo HEP (HE). **F)** Fragmento de hidrogel (\*) en grupo BEM, mostrando infiltración celular (flechas), y detalle la zona central (HE). Barras: 100  $\mu$ m.



**IMÁGENES PANORÁMICAS – 3d****CTRL-S****CTRL-D****PLCB****HEP****BEM**

**Figura 22:** Imágenes panorámicas a 3 días. Los grupos con hidrogeles, en especial HEP y BEM, mostraron un mejor sellado en los bordes y un aspecto menos desorganizado que el control diabético. Todos los grupos diabéticos presentaron una mayor respuesta inflamatoria que los animales sanos (PLCB, BEM: HE; CTRL-S, CTRL-D, HEP: TM).

### Estudios a 7 días

Una semana después de la realización del defecto, el tejido mostró características típicas de las fases inflamatoria y proliferativa de la reparación cutánea. En este tiempo, pudo observarse la formación de tejido de granulación, acompañado de angiogénesis y síntesis de nuevo colágeno, así como un avance de los bordes epiteliales. El número de células inflamatorias en todo el tejido continuó siendo considerable, aunque la presencia de leucocitos polimorfonucleares no resultó tan elevada como en tiempos anteriores.

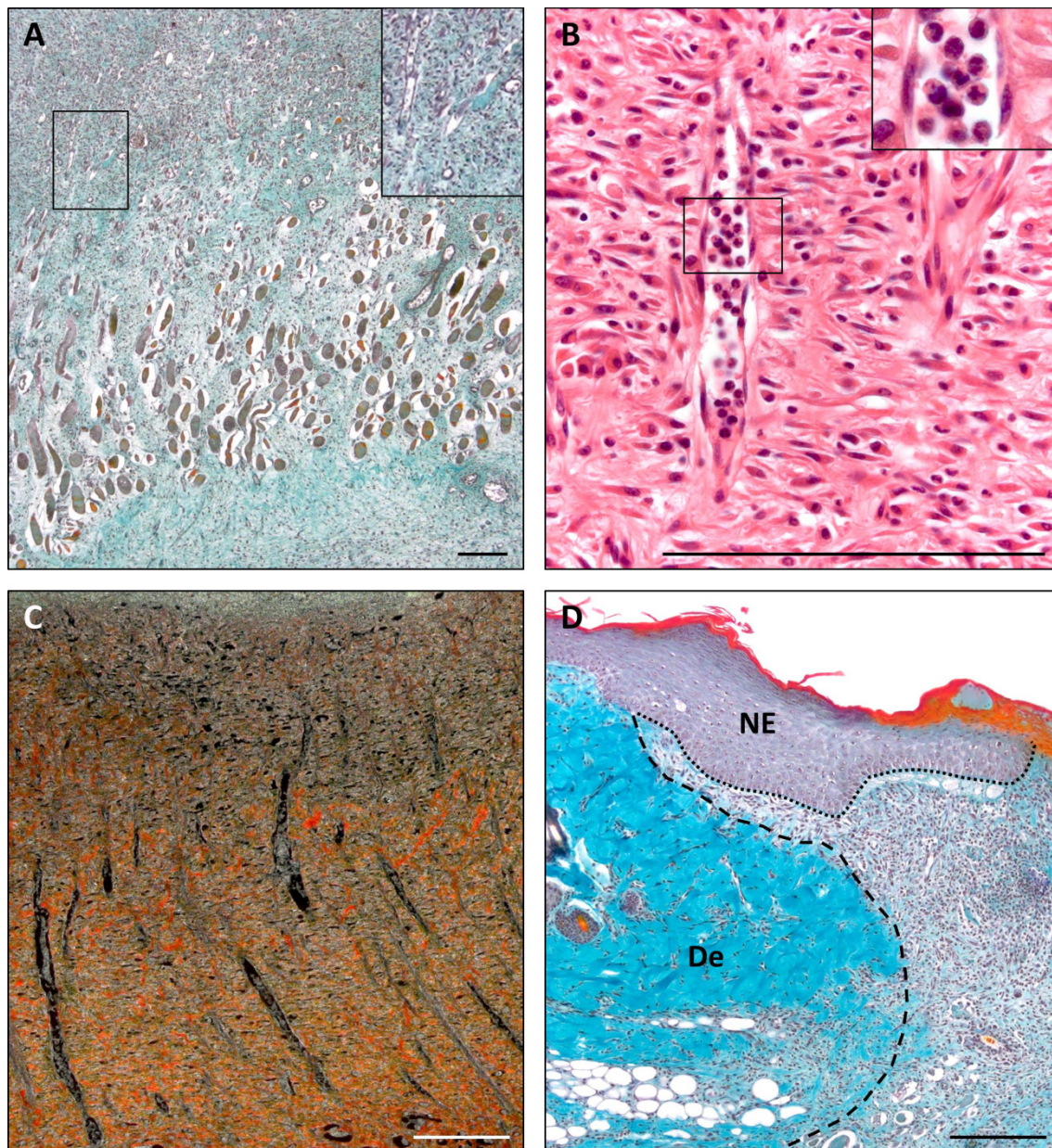
Los animales del grupo CTRL-S mostraron una evolución normal del proceso cicatrizal. Pudo verse una gran formación de tejido de granulación, desarrollándose a partir del tejido neoformado en los bordes observado a día 3, junto con una masa central cuya procedencia parecía ser el tejido subyacente previamente expuesto. Las células fibroblastoides del tejido mostraron una tendencia a alinearse sobre el eje que une ambos extremos. La superficie del tejido se encontraba cubierta por exudado inflamatorio, mientras que en las zonas profundas se pudo observar la presencia de zonas edematosas y áreas en las que las fibras musculares adyacentes tomaban un aspecto de aparente reorganización (**Figura 23A**). Se observó la formación de una gran cantidad de vasos sanguíneos (**Figura 23B**) irradiando desde la vasculatura de esta zona hacia la superficie del defecto perpendicularmente, así como de forma oblicua desde la zona bajo los bordes de la piel no dañada en los extremos del defecto. Infiltradas entre el tejido, aún se pudo ver una importante presencia de células inflamatorias, confiriendo al tejido un aspecto altamente celular característico. De manera general, la presencia de neutrófilos fue menor, exceptuando las zonas de respuesta aguda a cuerpo extraño. La tinción de las muestras con rojo sirio mostró un aumento de la presencia de colágeno en el nuevo tejido con respecto al tiempo anterior, especialmente en las zonas más maduras (**Figura 23C**). Asimismo, la epitelización comenzó a mostrar un avance, observándose migración de las lenguas epiteliales sobre la zona de tejido neoformado a partir de los bordes (**Figura 23D**). La unión del epitelio con el tejido subyacente se evidenció laxa, favoreciendo la migración de los queratinocitos.

La observación de las muestras del grupo CTRL-D mostró, en términos generales, una peor calidad en el proceso de cicatrización, con un comportamiento mucho más irregular que el control sano. El tejido de granulación formado mostró una fuerte presencia de componente inflamatorio, mayor que la observada en el grupo CTRL-S (**Figura 24A, B**). El grosor de este tejido fue menor, con aspecto poco organizado y una presencia de colágeno de nueva síntesis más reducida, especialmente en las zonas de inflamación más intensa (**Figura 24C**). La angiogénesis en este grupo no mostró diferencias en el número de vasos ni en su disposición, pero se apreciaron deficiencias en el proceso de epitelización, el cual mostró un patrón de avance alterado, concurrente con la insuficiente granulación, y un menor grosor de los frentes de migración (**Figura 24D**).

El tratamiento con hidrogel sin funcionalizar no mejoró la reparación epitelial en cuanto a su grosor, aunque sí mostró mejoras en la calidad del tejido de granulación. En las muestras de los grupos PLCB, HEP y BEM fue frecuente observar restos de hidrogel rodeados e infiltrados de células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos y células gigantes de cuerpo extraño) en proceso de degradación dentro del tejido de granulación (**Figura 24E, F**). El grupo PLCB resultó más homogéneo, mostrando un incremento en el grosor y colagenización del nuevo tejido frente a los controles diabéticos (**Figura 25A**). Los animales del grupo HEP mostraron un tejido de granulación de aspecto homogéneo y organizado, con una presencia de células inflamatorias menos intensa que el grupo CTRL-D (**Figura 25B**). No se vieron diferencias en la vascularización, aunque el depósito de colágeno observado fue mayor que en el control diabético (**Figura 25C**). Asimismo, se pudo observar un avance en el proceso de epitelización, tanto en longitud como en grosor de la lengua epidérmica, comenzando su migración sobre el tejido neoformado (**Figura 25D**). Esta mejoría fue también reconocida en los animales tratados con hidrogeles BEM, presentando una epitelización similar a la observada en el grupo HEP (**Figura 25E**). La presencia de células inflamatorias en el tejido fue mayor en el grupo BEM que en el grupo HEP; pese a ello, el tejido de granulación en el grupo BEM presentó un aspecto organizado, con buena vascularización y colagenización (**Figura 25F**).

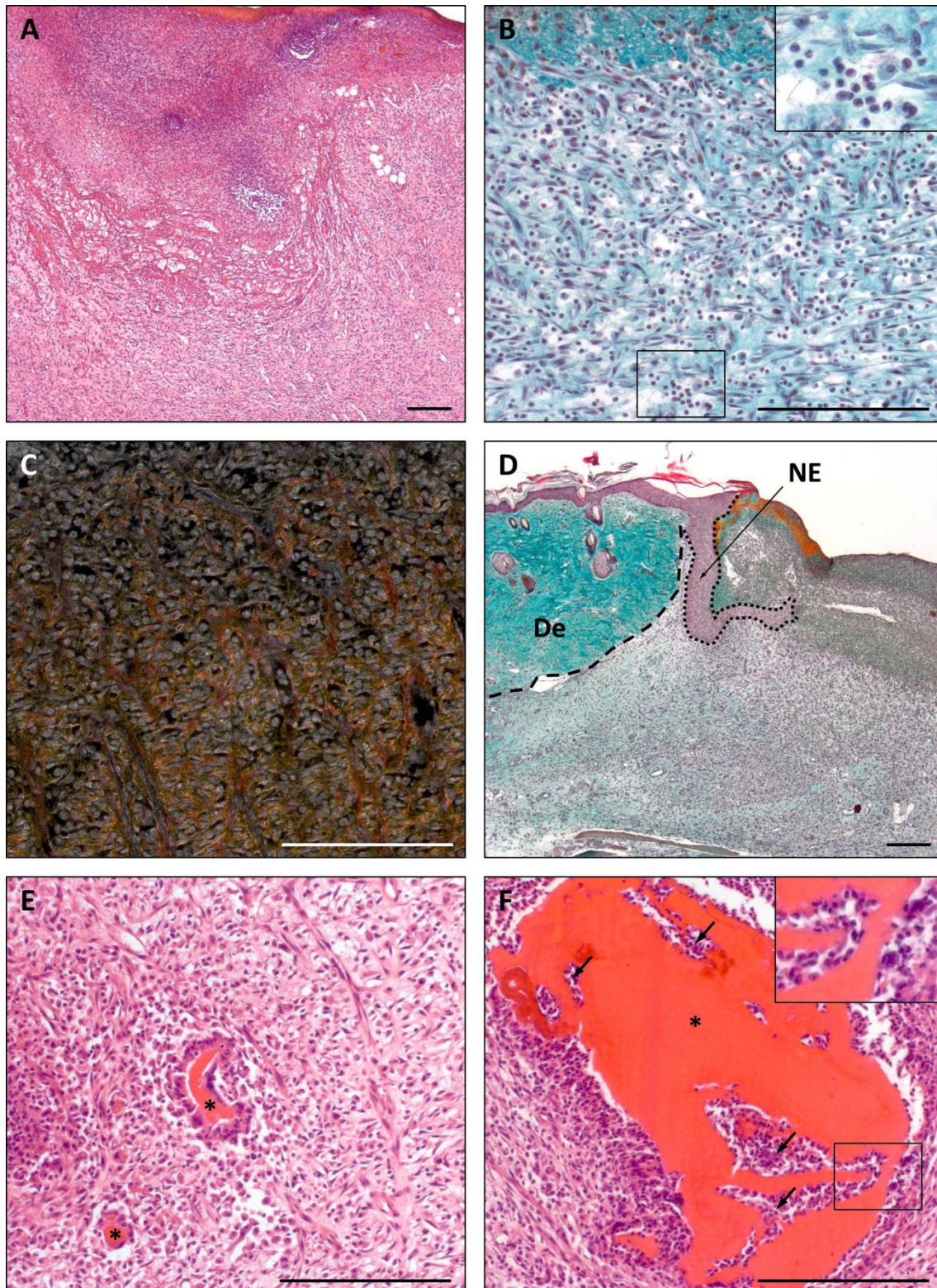


De manera general, en este tiempo de estudio los animales diabéticos mostraron un estado más inflamatorio que los sanos. Dentro de los primeros, el grupo HEP mostró un mejor comportamiento, seguido de BEM y, tras este, PLCB, siendo CTRL-D el grupo que mostró el proceso de cicatrización más retrasado (**Figura 26**).



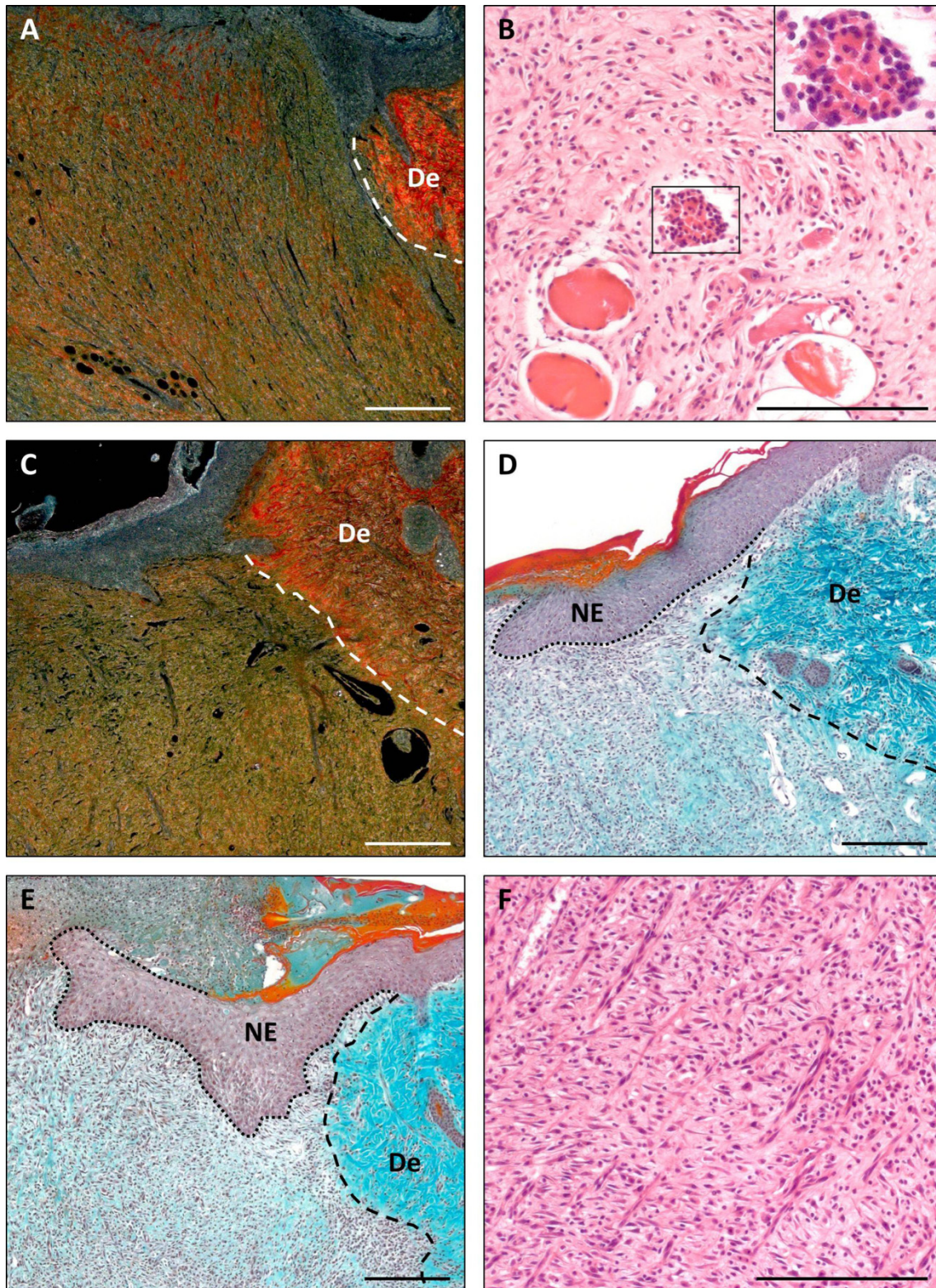
**Figura 23:** Imágenes histológicas a 7 días (I). **A)** Reorganización de las fibras musculares esqueléticas en grupo CTRL-S y detalle nuevos vasos (TM). **B)** Vasos neoformados en grupo CTRL-S y detalle de neutrófilos en su interior (HE). **C)** Colagenización en grupo CTRL-S (RS). **D)** Borde del defecto en grupo CTRL-S (TM). Líneas discontinuas: límite de la dermis intacta (**De**). Líneas de puntos: límite de la neopidermis (**NE**). Barras: 200 μm.





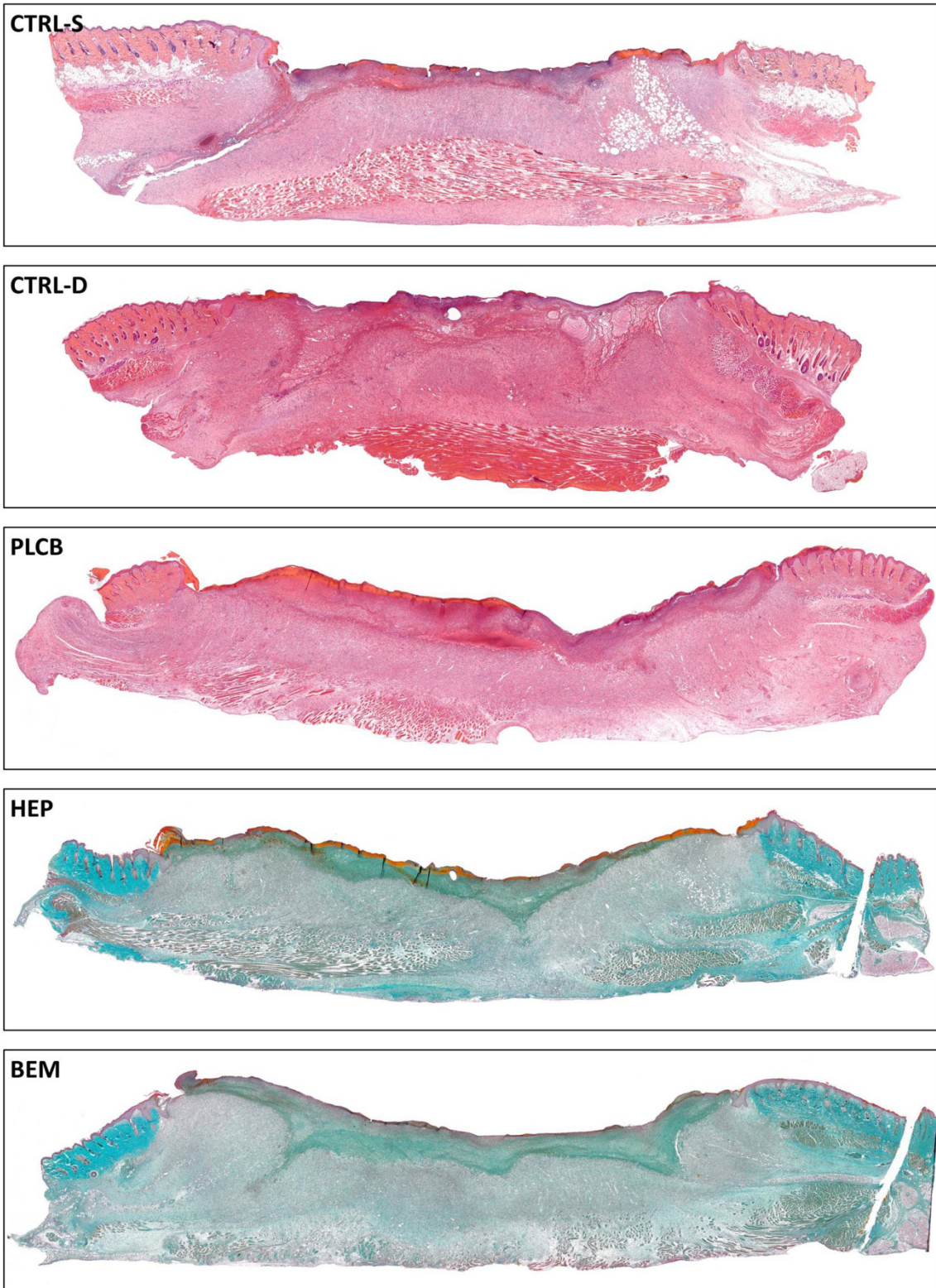
**Figura 24:** Imágenes histológicas a 7 días (II). **A)** Tejido de granulación en grupo CTRL-D (HE). **B)** Tejido de granulación en grupo CTRL-D y detalle de leucocitos infiltrados (TM). **C)** Colagenización en grupo CTRL-D (RS). **D)** Borde del defecto en grupo CTRL-D (TM). **E)** Restos de hidrogel (\*) en degradación en grupo PLCB (HE). **F)** Fragmento de hidrogel BEM (\*) con infiltración celular (flechas) y detalle del borde e infiltrado (HE). Líneas discontinuas: límite de la dermis intacta (**De**). Líneas de puntos: límite de la neoepidermis (**NE**). Barras: 200  $\mu$ m.





**Figura 25:** Imágenes histológicas a 7 días (III). **A)** Colagenización en grupo PLCB. (RS). **B)** Tejido de granulación en grupo HEP y detalle de reorganización de las fibras musculares (HE). **C)** Colagenización en grupo HEP (RS). **D)** Borde del defecto en grupo HEP (TM). **E)** Borde del defecto en grupo BEM (TM). **F)** Tejido de granulación en grupo BEM (HE). Líneas discontinuas: límite de la dermis intacta (**De**). Líneas de puntos: límite de la neopidermis (**NE**). Barras: 200  $\mu$ m.



**IMÁGENES PANORÁMICAS – 7d**

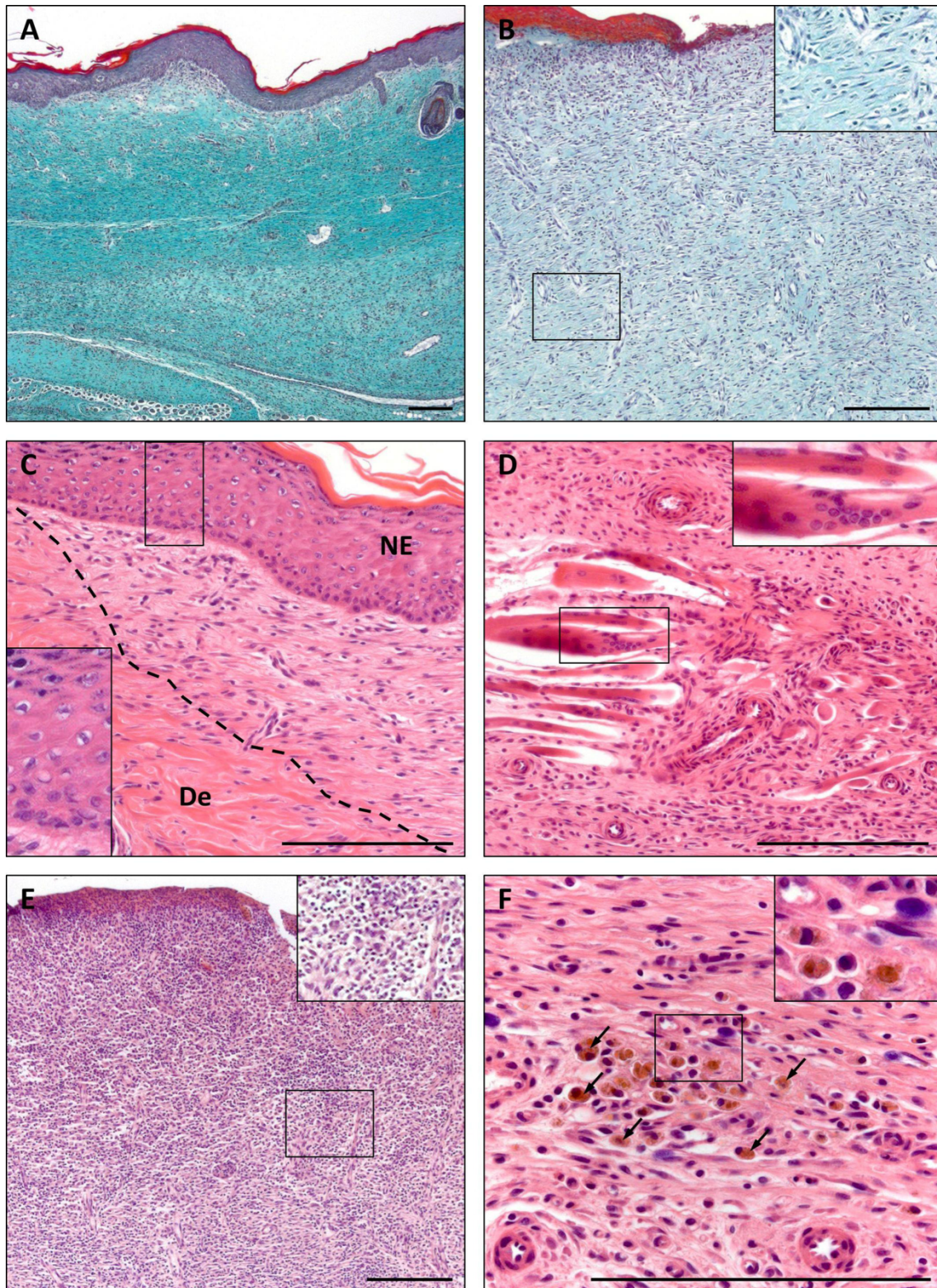
**Figura 26:** Imágenes panorámicas a 7 días. Los animales del grupo CTRL-D mostraron retraso en la cicatrización con respecto a los animales sanos. El tratamiento con hidrogeles cargados con heparinas mejoró este comportamiento, observándose un tejido más homogéneo y desarrollado, así como una epitelización de mejor calidad (CTRL-S, CTRL-D, PLCB: HE; HEP, BEM: TM).

### Estudios a 14 días

Este tiempo de estudio se caracterizó por una importante aproximación de bordes debida a la contracción de la herida, así como por un descenso paulatino de la inflamación tisular y el comienzo de la maduración del tejido.

El grupo de estudio CTRL-S mostró evidentes características de contracción tisular. Pudo observarse una clara aproximación de los bordes del defecto, los cuales adoptaron un perfil inclinado, de manera que las zonas superiores (epidermis y dermis) se encontraban más cerca del centro de la herida, mientras que los panículos inferiores aparecían más alejados. El tejido de granulación se vio más homogéneo que en tiempos anteriores, habiéndose fusionado las zonas de origen marginal y central. Pudo observarse en gran medida una alineación de las células (miofibroblastos) y de la nueva matriz a lo largo del eje que unía los extremos. Este tejido mostró un descenso en su celularidad, debido principalmente al comienzo de la retracción vascular y a la menor presencia de células inflamatorias (**Figura 27A, B**). Dentro de estas, la presencia de polimorfonucleares infiltrados fue mucho menor que en tiempos anteriores, siendo en este tiempo predominantes los leucocitos mononucleares. La gran mayoría de las células inflamatorias se encontraron en las capas más superficiales, aunque con cierta frecuencia pudieron encontrarse macrófagos cargados con hemosiderina a lo largo del tejido. En las zonas más profundas, sobre las zonas de músculo y/o tejido adiposo, se encontró un tejido conjuntivo más laxo. Este tejido presentó una vascularización reticular, a partir de la cual se originaban los vasos que discurrían hacia la superficie a través del tejido de granulación. Aunque la cantidad de vasos sanguíneos continuó siendo elevada, el calibre de los mismos fue menor que en el tiempo de estudio anterior. La presencia de colágeno fue muy superior a la observada en tiempos anteriores, mostrando asimismo un aspecto compacto y organizado de los nuevos haces. La epitelización del defecto continuó su avance, aunque pudo observarse una menor contribución proporcional al cierre del defecto que la realizada por la contracción tisular. El nuevo epitelio presentó un buen grosor, con una adecuada estratificación (**Figura 27C**). En este tiempo fue frecuente observar, en todos los grupos, zonas de tejido muscular en reorganización formando estructuras tubulares multinucleadas (**Figura 27D**).





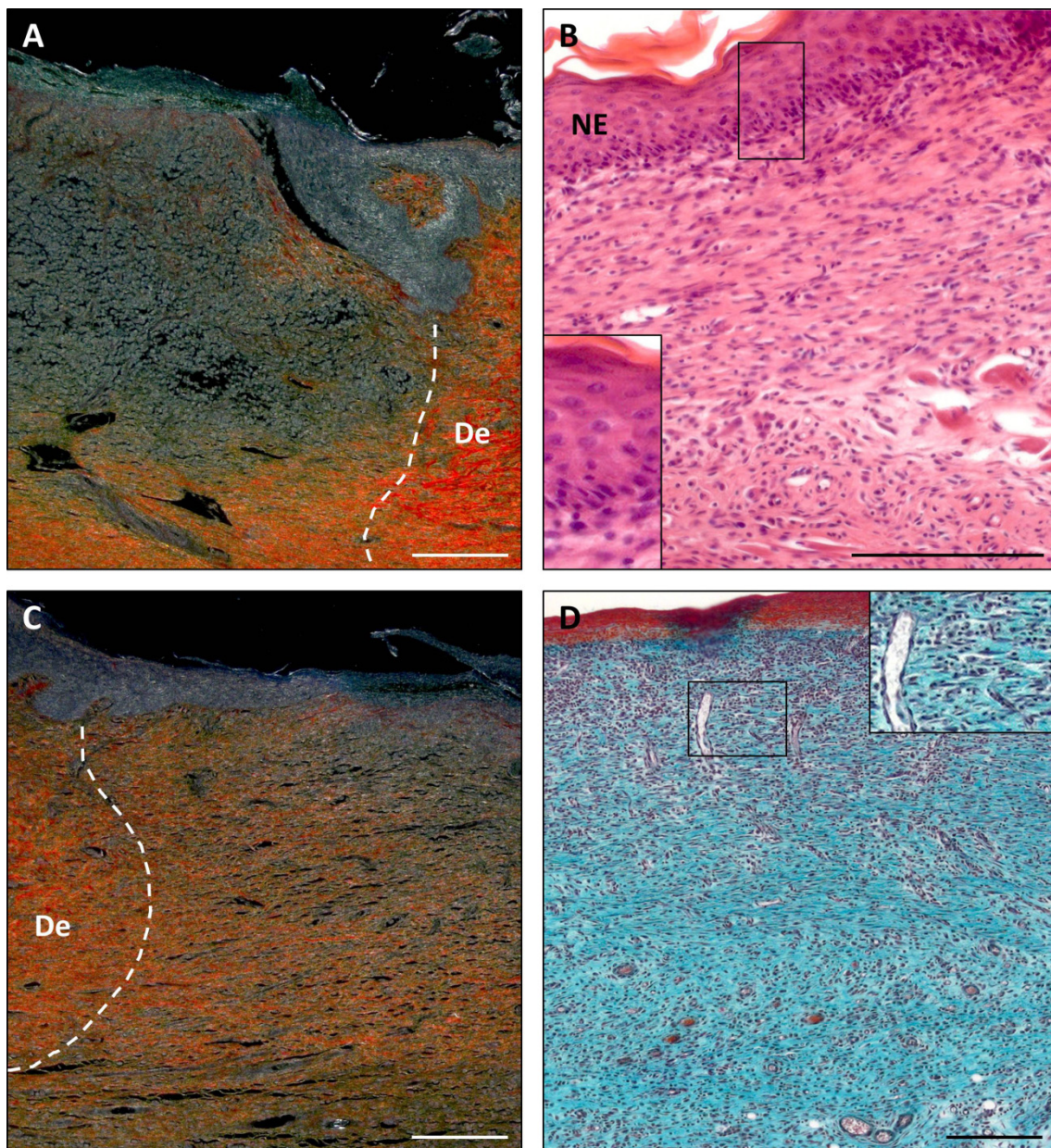
**Figura 27:** Imágenes histológicas a 14 días (I). **A)** Aspecto del nuevo tejido en grupo CTRL-S (TM). **B)** Tejido neoformado en grupo CTRL-S (TM). **C)** Epitelización en grupo CTRL-S (HE). **D)** Fibras musculares en reorganización en grupo PLCB y detalle de las mismas (HE). **E)** Aspecto del nuevo tejido en grupo CTRL-D y detalle de la inflamación tisular presente (HE). **F)** Presencia de macrófagos cargados con hemosiderina (flechas) en grupo CTRL-D y detalle de los mismos (HE). Líneas discontinuas: límite de la dermis intacta (**De**). **NE:** neoepidermis. Barras: 200  $\mu$ m.

Los animales del grupo control diabético mostraron de manera general una granulación de peor calidad. El tejido neoformado presentó un espesor más reducido que el grupo CTRL-S, así como un aspecto más desorganizado. La inflamación tisular fue más elevada (**Figura 27E**), mostrando una gran presencia de macrófagos y células gigantes de cuerpo extraño por todo el tejido. En este grupo también se observaron macrófagos cargados con hemosiderina, especialmente en la zona media del nuevo tejido (**Figura 27F**). Pudo verse una menor aproximación de los bordes, así como un alineamiento de células y fibras deficiente, presente sobre todo en las capas más superficiales. La vasculatura del tejido de granulación fue muy patente, con un elevado número de vasos de gran tamaño, en contraste con lo observado en el grupo sano. La tinción con rojo sirio reveló una menor cantidad de colágeno de nueva formación que en el grupo CTRL-S, siendo especialmente notable en las zonas en las que la presencia de células inflamatorias fue mayor (**Figura 28A**). El proceso de epitelización mostró asimismo diferencias, con un grosor reducido y una peor estratificación de la neoepidermis (**Figura 28B**). Aunque los animales del grupo PLCB mostraron ligeras diferencias, la respuesta observada fue similar al grupo CTRL-D. El tejido neoformado presentó un grosor ligeramente mayor, y pudo observarse un incremento en la presencia de colágeno (**Figura 28C**). Sin embargo, la inflamación tisular y el estado de la vasculatura no mostraron diferencias con el grupo control diabético (**Figura 28D**). Tampoco se pudieron constatar cambios en cuanto a la aproximación de bordes ni a la reepitelización, observándose en este grupo una respuesta heterogénea en estos procesos. Por el contrario, los animales de los grupos HEP y BEM mejoraron la respuesta observada en CTRL-D en cuanto a la epitelización. Ambos grupos mostraron una neoepidermis gruesa y correctamente estratificada, avanzando sobre el nuevo tejido (**Figura 29A, C**). En el grupo HEP, el tejido neoformado presentó una inflamación tisular más moderada y una menor celularidad general frente al resto de grupos diabéticos (**Figura 29D**). Asimismo, se observó una mayor acumulación de colágeno en este grupo, ofreciendo un aspecto denso y ordenado del mismo (**Figura 29B, E**). Por su parte, el grupo BEM mostró un tejido de nueva formación grueso y ordenado, con una respuesta inflamatoria más moderada que CTRL-D y PLCB, aunque mayor que la de HEP (**Figura 29F**). Del mismo modo, la presencia de colágeno en el grupo BEM fue



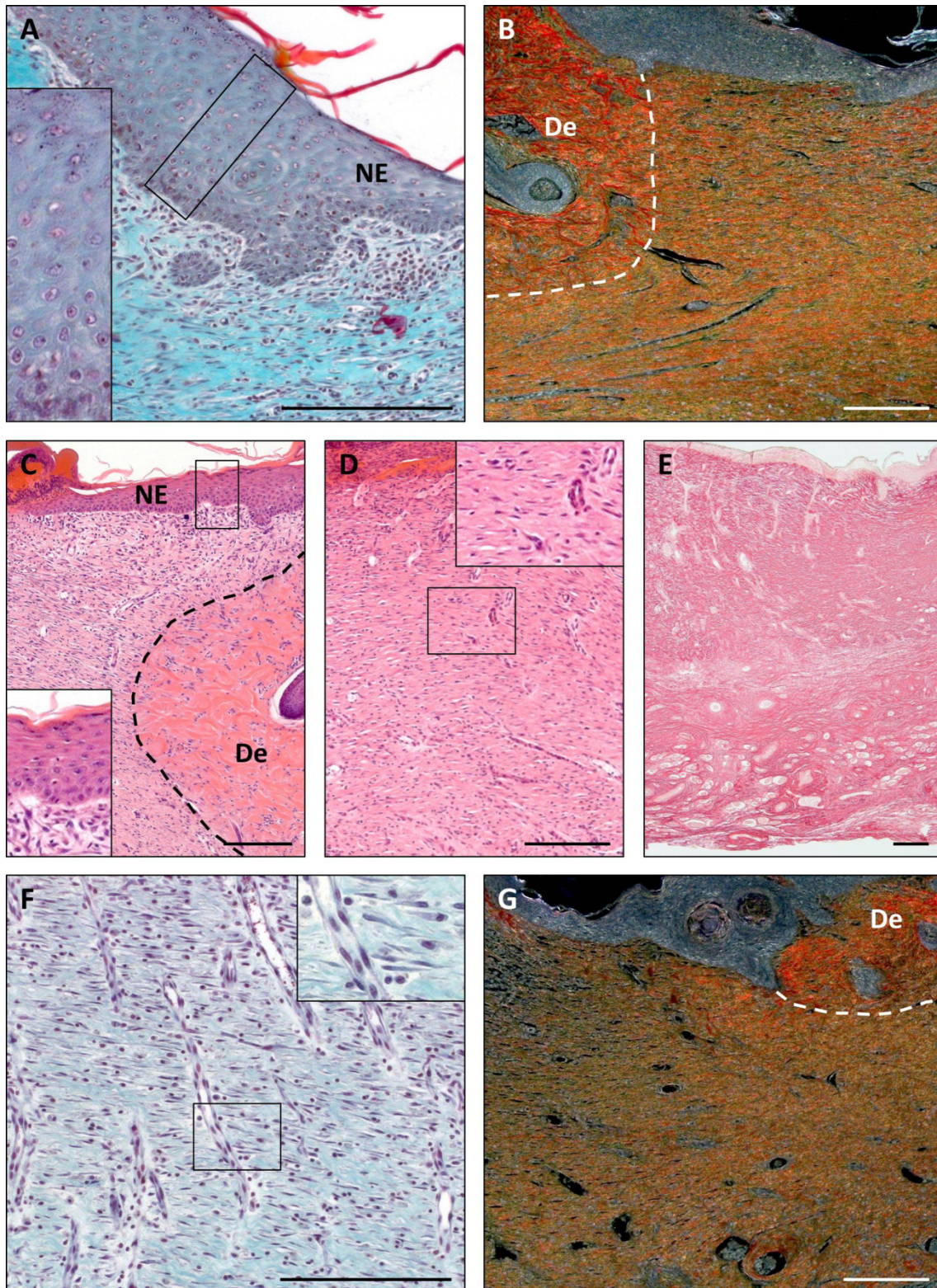
mayor que en los grupos control diabético y placebo (**Figura 29G**), aunque no se observaron diferencias destacables en la vascularización del tejido.

Globalmente, el mejor comportamiento observado dentro de los animales diabéticos fue el del grupo HEP, seguido de BEM. PLCB mostró un cierre ligeramente mejor que CTRL-D, pero ambos mostraron características de estadios más tempranos del proceso de cicatrización, al compararlos con los grupos de hidrogeles con heparinas (**Figura 30**).



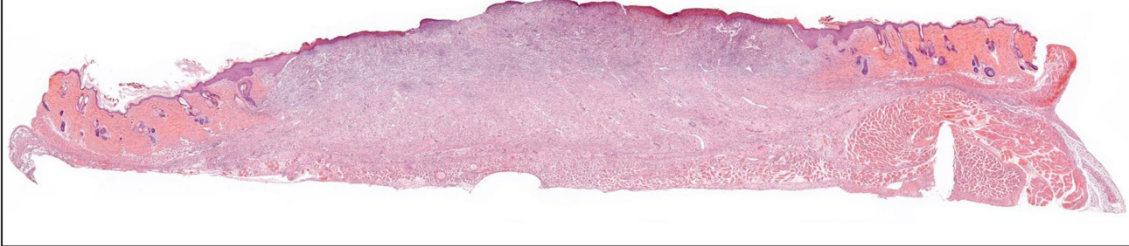
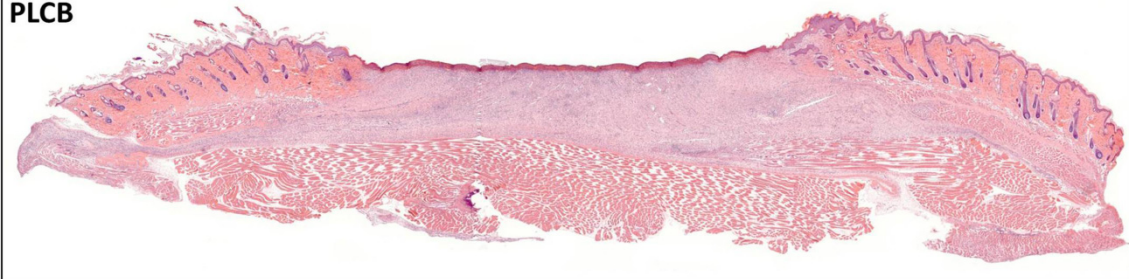
**Figura 28:** Imágenes histológicas a 14 días (II). **A)** Colagenización en grupo CTRL-D (RS). **B)** Epitelización en grupo CTRL-D (HE). **C)** Colagenización en grupo PLCB (RS). **D)** Aspecto del nuevo tejido en grupo PLCB y detalle de la vasculatura e infiltración inflamatoria (TM). Líneas discontinuas: límite de la dermis intacta (De). NE: neoepidermis. Barras: 200  $\mu$ m.





**Figura 29:** Imágenes histológicas a 14 días (III). **A)** Epitelización en grupo HEP (TM). **B)** Colagenización en grupo HEP (RS). **C)** Avance epitelial en el grupo BEM (HE). **D)** Aspecto del nuevo tejido en grupo HEP y detalle del mismo (HE). **E)** Presencia de colágeno en grupo HEP (RS). **F)** Tejido neoformado en grupo BEM y detalle del mismo (TM). **G)** Colagenización en grupo BEM (RS). Líneas discontinuas: límite de la dermis intacta (**De**). **NE:** neoepidermis. Barras: 200  $\mu$ m.



**IMÁGENES PANORÁMICAS – 14d****CTRL-S****CTRL-D****PLCB****HEP****BEM**

**Figura 30:** Imágenes panorámicas a 14 días. Comparado con los animales sanos, el grupo CTRL-D mostró alteraciones en el proceso de cicatrización, caracterizadas por una elevada inflamación tisular. El tratamiento con hidrogel placebo mejoró ligeramente esta condición, mientras que en los grupos BEM y HEP se observó un incremento notable en la calidad de la respuesta reparativa, especialmente en este último, mostrando inflamaciones moderadas y tejidos más maduros (HE y TM).

### Estudios a 21 días

En las muestras a 21 días se observó una continuación de la contracción tisular y de la epitelización. El tejido de granulación mostró una tendencia hacia la reducción de la celularidad y la maduración de la neomatriz.

Los animales del grupo CTRL-S presentaron una gran aproximación de bordes, provocada por la continuación del proceso de contracción. La morfología inclinada de los extremos observada en tiempos anteriores se acentuó, originando un tejido cicatrizal de aspecto trapecial, más corto en la zona superior que en la inferior. Este tejido neoformado mostró una celularidad reducida con respecto a tiempos anteriores, principalmente debido a una disminución de la infiltración inflamatoria, a la retracción de la vasculatura formada durante la fase proliferativa y al menor número de células fibroblastoides presentes en la matriz (**Figura 31A**). Estos fenómenos fueron particularmente evidentes en las zonas cercanas a los bordes, donde el nuevo tejido mostró un aspecto más maduro. En algunos casos pudieron observarse pequeños focos inflamatorios debidos a la presencia de algún cuerpo extraño. La presencia de colágeno en la nueva matriz fue abundante por todo el tejido neoformado, presentando un aspecto denso y ordenado (**Figura 31B, C**), y los vasos sanguíneos del tejido mostraron un menor número y tamaño que en los tiempos de estudio anteriores. El nuevo epitelio formado presentó un buen grosor, y siguió un ritmo de avance similar al observado anteriormente (**Figura 31D**), con aportación al cierre proporcionalmente menor que la contracción.

En el grupo CTRL-D pudieron observarse importantes diferencias con respecto a CTRL-S en el tejido incipiente. Aunque la aproximación de bordes observada en este grupo fue comparable al grupo sano, el grosor del tejido neoformado fue marcadamente menor. De manera general, este grupo mostró una mayor inflamación tisular y un elevado número de vasos con una disposición poco homogénea y un tamaño mayor que en el grupo CTRL-S. Fue frecuente observar en el tejido neoformado capas de diferente aspecto y constitución, alternando zonas con matriz alineada e inflamación moderada (generalmente localizadas en la superficie) con otras franjas altamente inflamadas, desorganizadas y de escasa matriz (**Figura 32A**). La presencia en este grupo de zonas

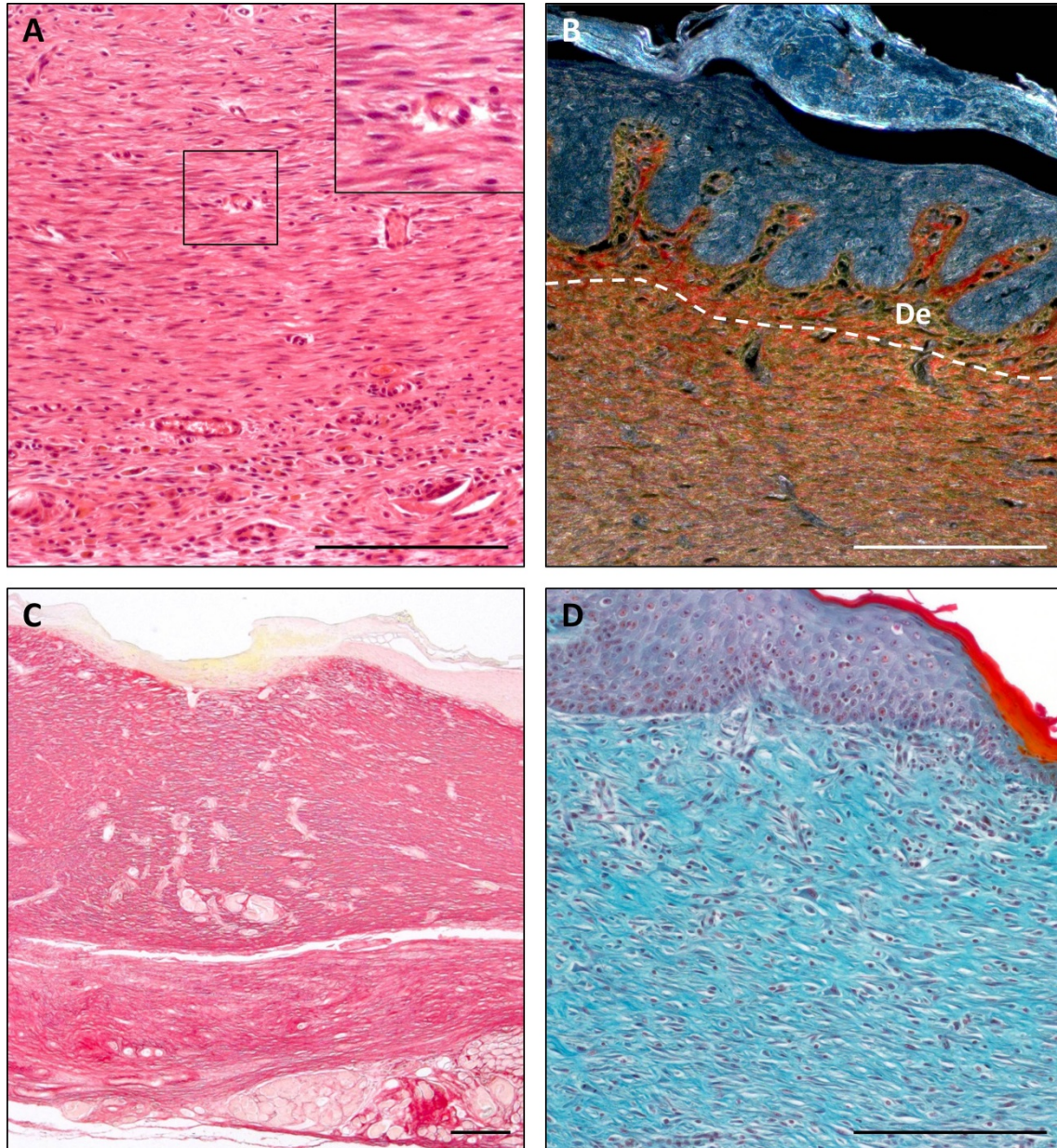


con una intensa respuesta inflamatoria a cuerpo extraño fue más frecuente que en el resto de los grupos de estudio (**Figura 32B**). Se observó una mayor tendencia a una respuesta inflamatoria a cuerpo extraño desmedida. La presencia de colágeno fue asimismo heterogénea, con una acumulación reducida asociada a las zonas de inflamación más elevada (**Figura 32C**), y siendo en general menor y peor organizada que en el grupo CTRL-S. El avance epitelial no mostró diferencias notables con el control sano, aunque el grosor del nuevo epitelio fue claramente menor en el grupo CTRL-D.

Las muestras de los animales del grupo PLCB mostraron un grosor del tejido neoformado similar al del grupo CTRL-D. Este grupo mostró resultados heterogéneos, aunque por término medio la inflamación tisular resultó menor y la colagenización mostró una mejoría con respecto a la observada en el grupo CTRL-D (**Figura 32D**). El tejido cicatrizal de este grupo se presentó más organizado, aunque pudieron verse frecuentemente zonas más inflamadas alternadas con otras de menor celularidad (**Figura 32E, F**). En cuanto a la epitelización, PLCB no mostró diferencias en el avance ni en el grosor epitelial frente a CTRL-D. En el grupo HEP se observó una menor inflamación tisular que en PLCB, aunque presentó focos con fuerte reacción a cuerpo extraño. El tejido cicatrizal se mostró más grueso que en CTRL-D y PLCB (**Figura 33A**), con una mayor abundancia y organización del colágeno de nueva síntesis (**Figura 33B**). La epitelización presentó un avance irregular, aunque la morfología y el espesor de la neoepidermis fueron buenos (**Figura 33C**). Dentro de los animales diabéticos, el grupo en el que se observó un mejor comportamiento fue BEM. El tejido neoformado mostró una reducida celularidad, con inflamación tisular moderada (**Figura 33D**), excepto en las zonas más superficiales sin epitelizar o junto a cuerpos extraños. La vasculatura presentó un menor calibre y número de los vasos, y pudo observarse una elevada presencia y densidad de colágeno de nueva síntesis (**Figura 33E**). En la superficie, se observó una neoepidermis gruesa y bien estratificada (**Figura 33F**).

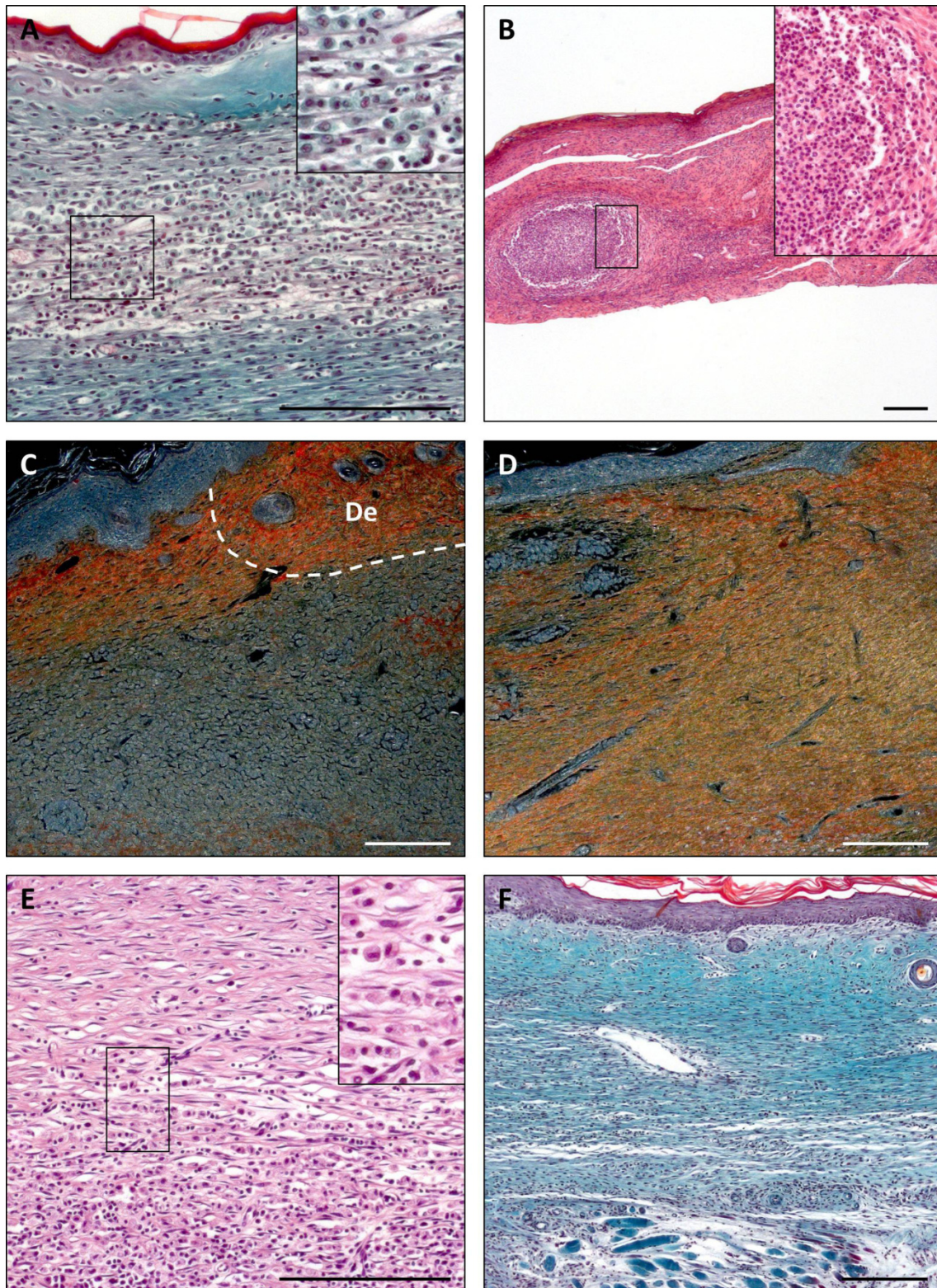
En términos generales, en este tiempo de estudio las muestras sanas mostraron un perfil más maduro que las diabéticas. En el caso de CTRL-D, los animales sufrieron una inflamación mucho más elevada, asociada a una deficiencia en la formación de nuevo tejido. Aunque la aplicación de hidrogeles PLCB logró mejorar este resultado, fueron

los grupos HEP y especialmente BEM los que mostraron un tejido cicatrizal menos inflamado y en un estado de maduración más avanzado (**Figura 34**).



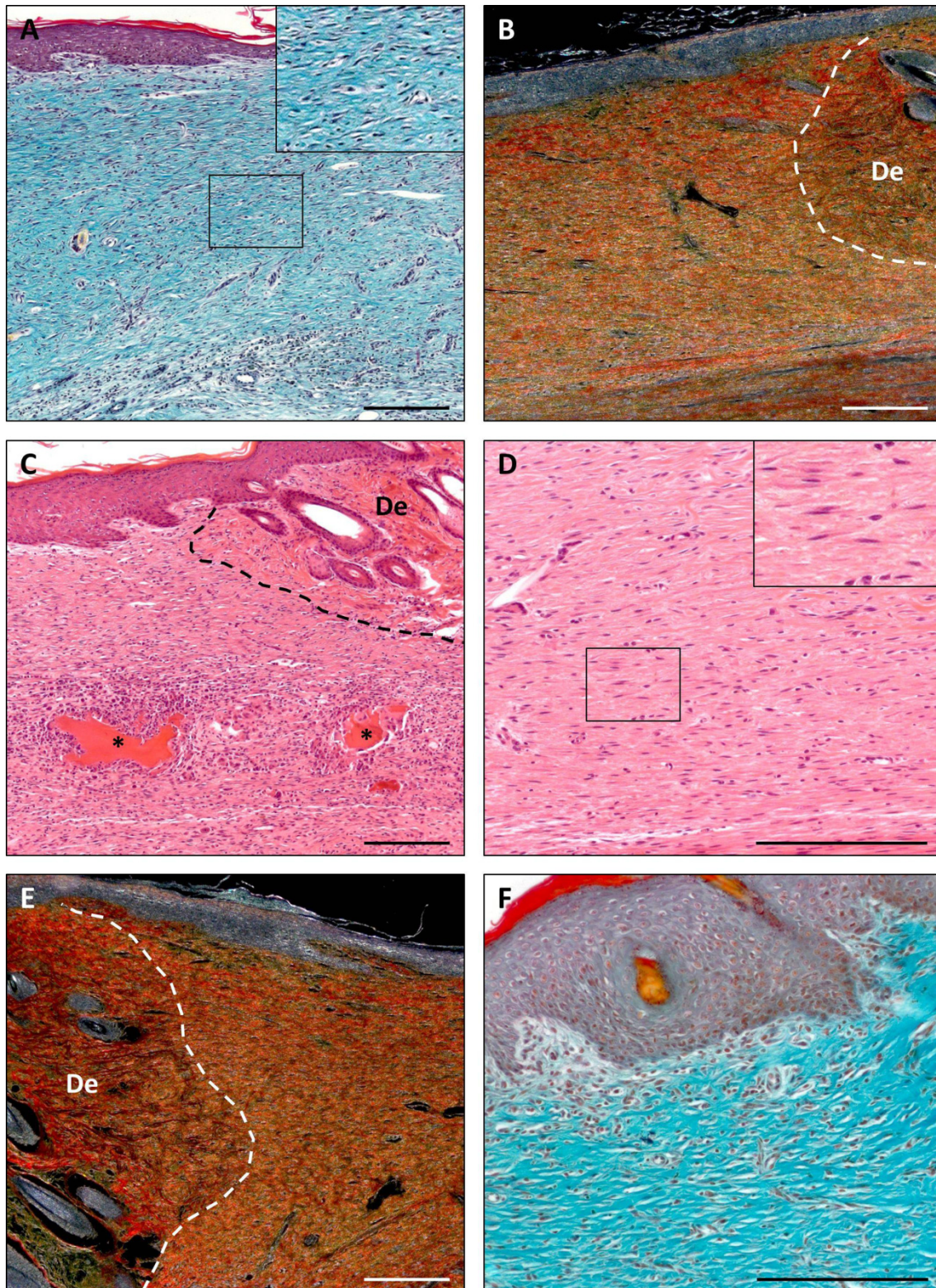
**Figura 31:** Imágenes histológicas a día 21 (I). **A)** Colagenización en grupo CTRL-S. Se observa tejido no dañado en la zona superior, correspondiente al borde perpendicular al plano de la imagen (RS). **B)** Tejido cicatrizal en grupo CTRL-S y detalle del mismo (HE). **C)** Presencia de colágeno en la zona del defecto en grupo CTRL-S (RS). **D)** Epitelización en grupo CTRL-S (TM). Líneas discontinuas: límite de la dermis intacta (De). Barras: 200  $\mu$ m.





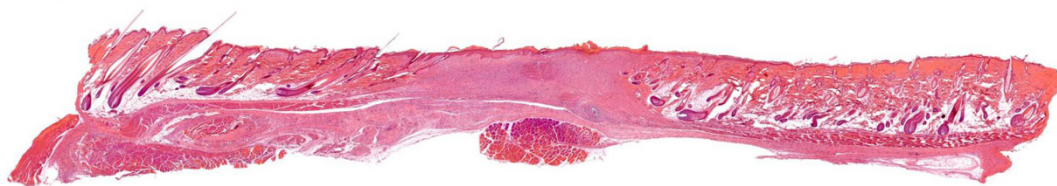
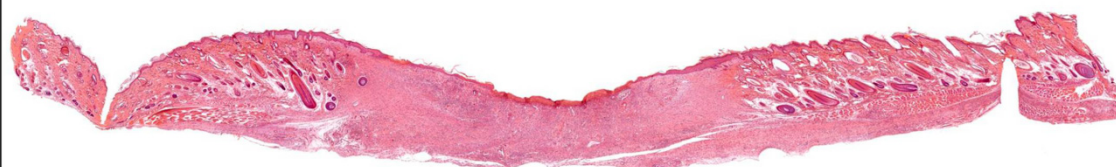
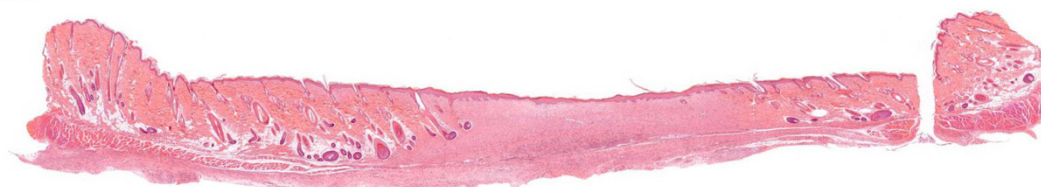
**Figura 32:** Imágenes histológicas a día 21 (II). **A)** Tejido cicatrizal en grupo CTRL-D y detalle del mismo (TM). **B)** Tejido cicatrizal en grupo CTRL-D y detalle de zona granulomatosa (HE). **C)** Colagenización en grupo CTRL-D (RS). **D)** Colagenización en grupo PLCB (RS). **E)** Tejido cicatrizal en grupo PLCB (HE). **F)** Aspecto de la zona del defecto en grupo PLCB (TM). Líneas discontinuas: límite de la dermis intacta (**De**). Barras: 200  $\mu$ m.





**Figura 33:** Imágenes histológicas a día 21 (III). **A)** Tejido cicatrizal en grupo HEP y detalle del mismo (TM). **B)** Colagenización en grupo HEP (RS). **C)** Epitelización en grupo HEP. Se observan restos de hidrogel (\*) y reacción inflamatoria asociada (HE). **D)** Tejido cicatrizal en grupo BEM y detalle del mismo (HE). **E)** Colagenización en grupo BEM (RS). **F)** Epitelización en grupo BEM (TM). Líneas discontinuas: límite de la dermis intacta (**De**). Barras: 200  $\mu$ m.



**IMÁGENES PANORÁMICAS – 21d****CTRL-S****CTRL-D****PLCB****HEP****BEM**

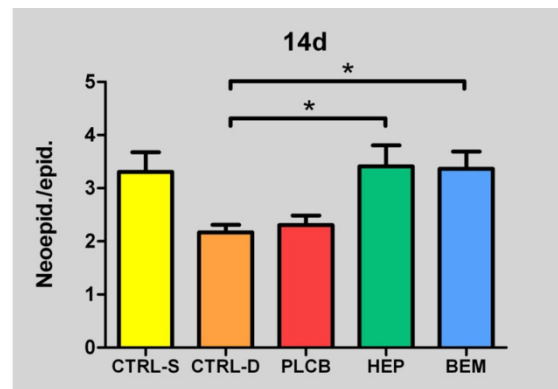
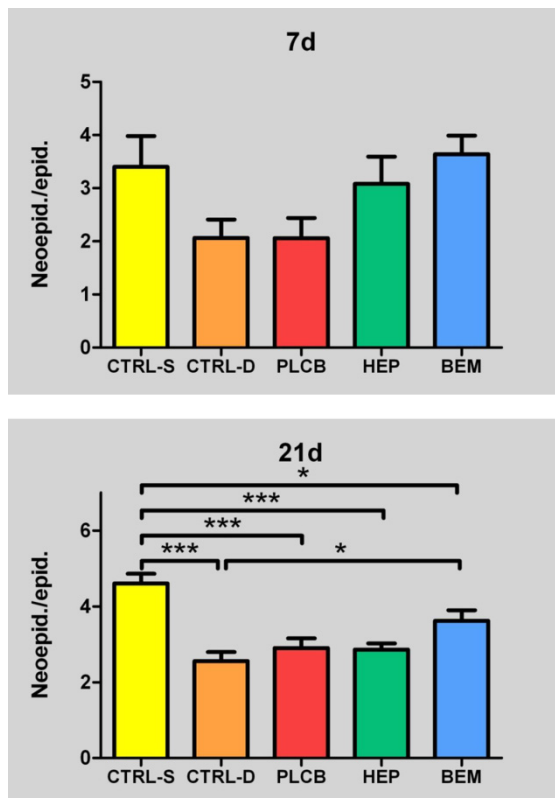
**Figura 34:** Imágenes panorámicas a 21 días. Los animales del grupo CTRL-S presentaron un tejido de cicatrizal en un estadio de reparación más avanzado, mientras que los controles diabéticos mostraron un perfil inflamatorio crónico, asociado con procesos cicatrizales comprometidos. En los grupos HEP y BEM pudo observarse una mejor calidad en la reparación del defecto, mostrando un tejido más maduro, con menos inflamación tisular y una neomatriz bien organizada y rica en colágeno. Este respuesta fue más clara en el grupo de estudio BEM, aunque sin llegar a alcanzar los resultados obtenidos en el grupo de animales no diabéticos (CTRL-S, PLCB, BEM: HE; CTRL-D, HEP: TM).

#### 4.2.2 Análisis micromorfométricos del tejido cicatrizal

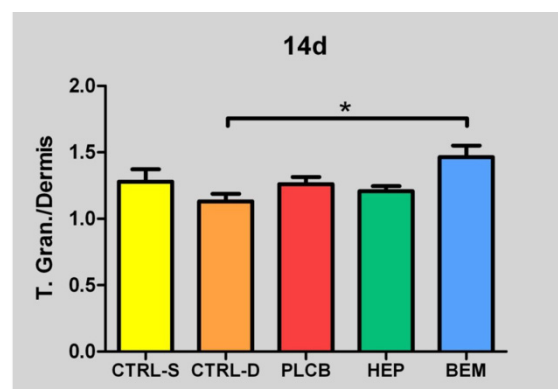
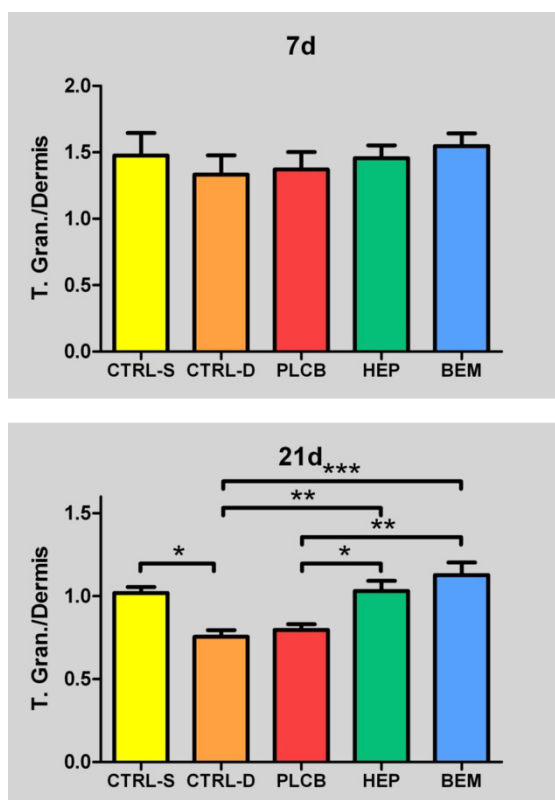
El análisis de la muestras de 3 días no resultó viable, debido a la ausencia en este tiempo de estudio de un tejido de granulación adecuadamente establecido y al estadio excesivamente temprano en el que se encontraba la migración epitelial.

En el resto de tiempos de estudio se observaron diferencias entre los grupos en el grosor de los frentes de epitelización. El grupo CTRL-S mostró en todos los tiempos un grosor medio superior a los observados en CTRL-D y PLCB. Los grupos HEP y BEM presentaron una epitelización más gruesa que los otros grupos diabéticos, especialmente a 14 días donde alcanzaron valores comparables al control sano. En el último tiempo de estudio (21 días), las diferencias entre los grupos diabéticos fueron menores, presentando BEM el mayor grosor neoepitelial ( $p \leq 0,05$  vs CTRL-D) (**Figura 35**).

Con respecto al análisis del tejido neoformado en la zona del defecto, todos los grupos mostraron un grosor similar a día 7. Aunque el grupo BEM presentó un aumento significativo del espesor a día 14 ( $p \leq 0,05$  vs CTRL-D), las mayores diferencias se mostraron en el día 21. En este tiempo, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grosor neodérmico, presentando CTRL-D y PLCB un tejido de menor espesor. Por el contrario, la respuesta observada en los grupos HEP y BEM consiguió igualar a la que presentó CTRL-S, alcanzando grosores similares a los del tejido no dañado de los bordes (**Figura 36**).



**Figura 35:** Análisis micromorfométrico de la epitelización a 7, 14 y 21 días. Los resultados están expresados como grosor de la neoepidermis normalizado frente a la epidermis no dañada. El grupo control sano mostró un mayor grosor neoepidérmico. Los animales tratados con hidrogeles BEM y HEP mejoraron la epitelización diabética, aunque el efecto fue menor en tiempos largos.



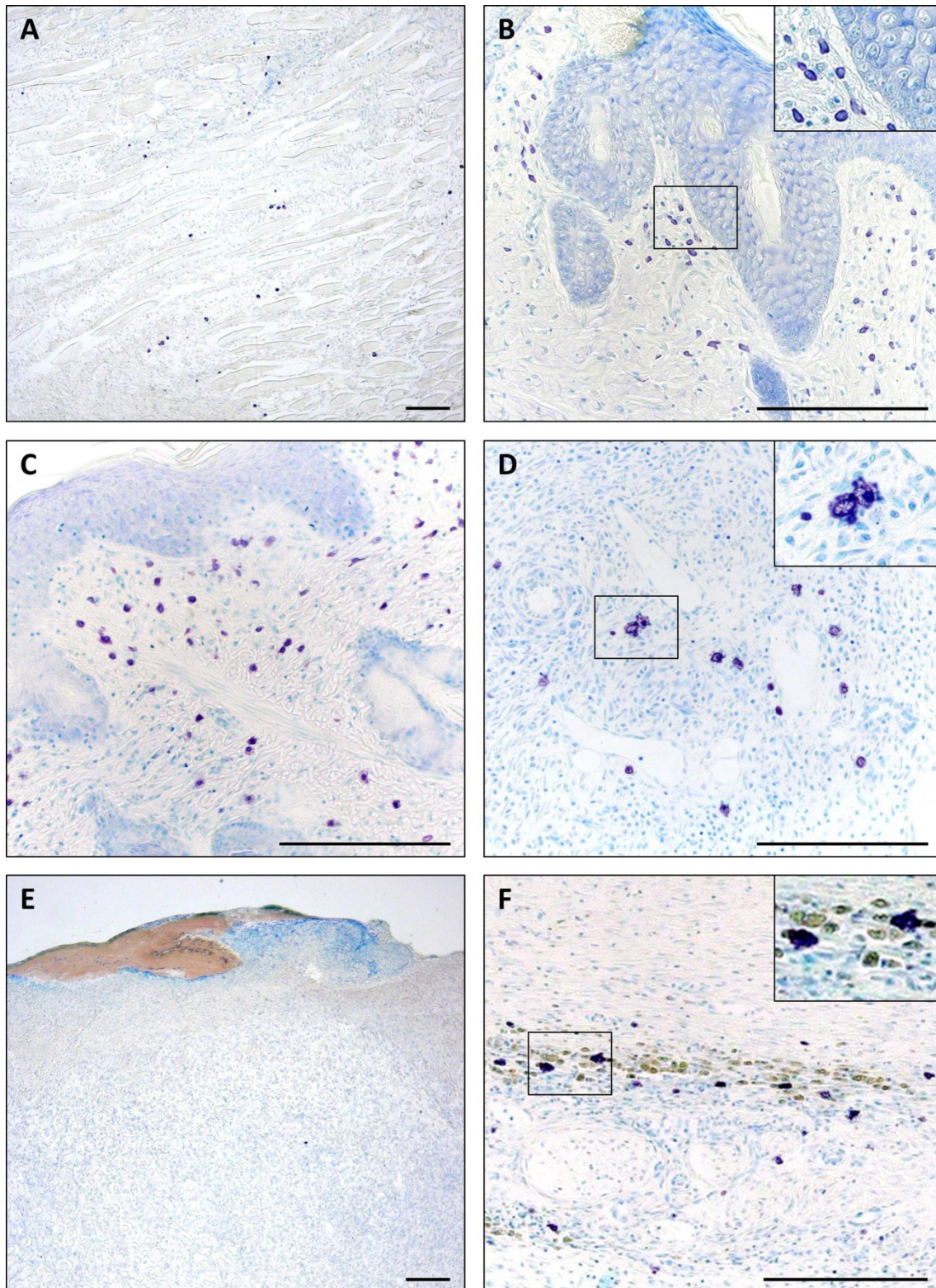
**Figura 36:** Análisis micromorfométrico del tejido neoformado a 7, 14 y 21 días. Los resultados están expresados como grosor del tejido normalizado frente a la dermis sin dañar. Aunque a tiempos cortos los grosores relativos fueron similares en todos los grupos, a día 21 se observó una clara deficiencia en el grosor de la granulación en los grupos diabéticos sin tratamiento y placebo, mientras que los grupos HEP y BEM mostraron unas dimensiones del nuevo tejido similar al grupo control sano.

### 4.2.3 Valoración de la respuesta mastocitaria

En los tiempos cortos, los mastocitos aumentaron su presencia en los bordes de la herida, especialmente en las zonas alrededor de los panículos carnoso y adiposo y bajo el epitelio. También se observó un incremento de su número en la zona inflamada de tejido expuesto, así como infiltrándose en los tejidos muscular y adiposo subyacente (**Figura 37A**). En las muestras de 7 días, pudo verse un gran número de mastocitos de pequeño tamaño bajo las zonas epiteliales (**Figura 37B**), cuya presencia se mantuvo durante los siguientes tiempos de estudio, acompañando el avance de la nueva epidermis (**Figura 37C**). En el tejido neoformado su presencia fue baja, observándose una lenta colonización a partir de los extremos de la herida y el tejido subyacente (**Figura 37D, E**). Aunque su cantidad fue aumentando a lo largo de los tiempos de estudio, en todos los casos mostraron un menor número que en los tejidos no dañados. Frecuentemente se observó a 14 y 21 días una colocación de mastocitos y macrófagos cargados con hemosiderina en las zonas profundas y medias del tejido neoformado (**Figura 37F**).

Los grupos de estudio presentaron perfiles similares de presencia mastocitaria, exceptuando el grupo CTRL-D. En este grupo pudo observarse una cantidad ligeramente menor de mastocitos en los bordes de la herida, así como una colonización del tejido de granulación sensiblemente disminuida. Por el contrario, los grupos HEP y BEM mostraron unos niveles similares al grupo CTRL-S en cuanto a la presencia mastocitaria en los bordes del defecto y a la colonización del tejido neoformado (**Tabla 5, Tabla 6**).





**Figura 37:** Observación de mastocitos (morado) destacando sobre el fondo azul ortocromático mediante tinción con azul de toluidina. **A)** Mastocitos infiltrándose entre las fibras del músculo expuesto (3d, CTRL-S). **B)** Borde epitelial y detalle de mastocitos bajo él (7d, PLCB). **C)** Presencia de mastocitos bajo el epitelio del borde del defecto (14d, BEM). **D)** Mastocitos migrando en el tejido de granulación y detalle de los mismos, observándose degranulación (7d, HEP). **E)** Colonización del tejido de granulación en el grupo CTRL-D (7d). **F)** Mastocitos asociados a macrófagos cargados de hemosiderina en la capa media del tejido de granulación y detalle de ambos tipos celulares (21d, PLCB). Barras: 200  $\mu$ m.

|        | 3d  | 7d  | 14d | 21d |
|--------|-----|-----|-----|-----|
| CTRL-S | ++  | +++ | ++  | +++ |
| CTRL-D | ++  | ++  | +   | ++  |
| PLCB   | ++  | ++  | ++  | +++ |
| HEP    | +++ | +++ | +++ | +++ |
| BEM    | +++ | +++ | +++ | ++  |

**Tabla 5:** Valoración de la presencia mastocitaria en los bordes del defecto. Resultados expresados como: presencia reducida (+); presencia media (++), presencia alta (+++).

|        | 3d* | 7d | 14d | 21d |
|--------|-----|----|-----|-----|
| CTRL-S | ++  | +  | +   | ++  |
| CTRL-D | +   | +  | -   | -   |
| PLCB   | ++  | +  | -   | ++  |
| HEP    | ++  | ++ | +   | ++  |
| BEM    | ++  | ++ | ++  | +   |

**Tabla 6:** Valoración de la presencia y colonización mastocitaria en el tejido neoformado. (\*) La valoración en los grupos de 3d fue realizada sobre el tejido expuesto, debido a la ausencia de tejido de granulación en ese tiempo de estudio. Resultados expresados como: (-) presencia mínima/ausencia; (+) inicio de colonización; (++) colonización moderada; (+++) colonización avanzada.

## 4.3 ESTUDIOS INMUNOHISTOLÓGICOS

### 4.3.1 Detección de $\alpha$ SMA: valoración de la neovasculatura y presencia miofibroblástica

Tanto en el caso de la formación de nuevos vasos como en el de la aparición de miofibroblastos (MFbs), las muestras de **3 días** de todos los grupos de estudio mostraron resultados negativos, debido a la ausencia de un tejido de granulación establecido.

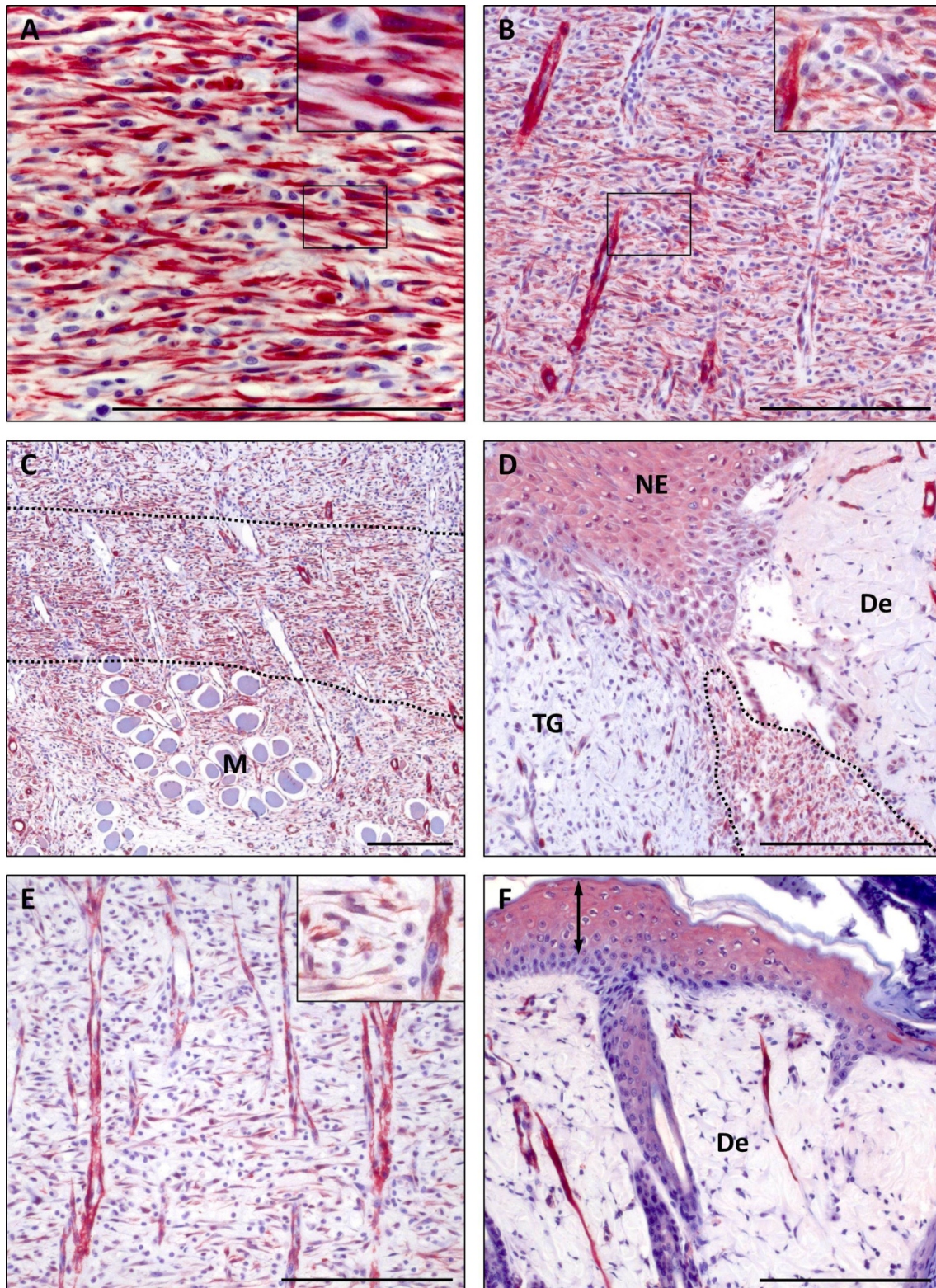
En las muestras sanas de **7 días** se observó la aparición de miofibroblastos (**Figura 38A**) dispersos en franjas por el tejido de granulación, preferentemente situadas en la zona media o profunda, sobre el tejido muscular estriado subyacente. También aparecieron asociados a los bordes del defecto, en las interfaces entre la dermis y el tejido de granulación. Los grupos diabéticos presentaron cantidades similares de MFbs, aunque con patrones de alineación más irregulares en PLCB y CTRL-D, especialmente en este último (**Figura 38B**). Por el contrario, HEP y BEM mostraron distribuciones y alineamientos más similares a los observados en el grupo sano, ordenados en bandas y junto a los bordes del defecto (**Figura 38C, D, E**). Todos los grupos mostraron un fuerte marcaje de vasos sanguíneos discurriendo hacia la superficie tisular, sin apreciarse diferencias en cuanto a su número. No obstante, el grupo CTRL-S presentó secciones vasculares de mayor tamaño.

A **14 días**, los animales sanos mostraron características de un inicio de la remisión de la presencia de MFbs. Su presencia se concentró bajo los epitelios en avance y en una banda estrecha superficial en el tejido de granulación (**Figura 39A**), mientras que el marcaje en las zonas profundas observado en tiempos anteriores dejó de aparecer, observándose tan solo células aisladas en estas áreas. En comparación con el control sano, los animales diabéticos presentaron una mayor presencia de miofibroblastos, así como una peor organización. En los grupos CTRL-D y PLCB fue frecuente observar parches de zonas marcadas intercalados con lugares de elevada inflamación tisular (**Figura 39B**), distribuidos por las zonas media y superior del tejido de granulación, con un grado de alineación medio. En los casos en los que se observó una franja continua, esta presentó un grosor elevado y se localizó bajo una banda superficial de células

inflamatorias (**Figura 39C**). Los grupos tratados con hidrogeles funcionalizados (HEP y BEM) mostraron una mejor organización, aunque con franjas más anchas que en el grupo CTRL-S, alternadas en ocasiones con bandas de alta inflamación, y presentando en general una disposición alineada (**Figura 39D**). En este tiempo de estudio se observó un mayor desarrollo de la vasculatura en todos los grupos, con valores cercanos al doble del número medido en el tiempo de 7 días. No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de secciones vasculares cuantificadas entre los cinco grupos de estudio, aunque pudo observarse un menor calibre de los vasos en el grupo CTRL-S.

En el último tiempo de estudio, **21 días**, CTRL-S mostró una tendencia a la desaparición de los MFbs, constatándose en estas muestras la presencia en bajo número limitada a la superficie central y los bordes, o incluso la ausencia de este tipo celular (**Figura 40A**). En el grupo CTRL-D se observó una elevada persistencia de MFbs formando bandas anchas dentro del tejido de neoformación, frecuentemente alternadas con zonas de elevada inflamación tisular (**Figura 40B**). En el grupo PLCB se observó una reducción en el número de células marcadas frente a CTRL-D, las cuales aparecieron principalmente en las zonas media y superior del tejido cicatrizal. Tanto el grupo HEP como BEM mostraron asimismo una densidad baja de MFbs, aunque la presencia fue mayor que la observada en CTRL-S. Los MFbs se localizaron mayoritariamente en la zona superficial central del nuevo tejido (**Figura 40C, D**), pudiendo observarse ocasionalmente focos de mayor densidad. Con respecto a la vasculatura, se observaron claras diferencias entre los cinco grupo en este tiempo de estudio. Frente a lo observado en el tiempo anterior, en el grupo CTRL-S el número de vasos se redujo aproximadamente un 50%, los cuales mostraron un calibre menor. Por el contrario, CTRL-D y PLCB mantuvieron valores similares a los cuantificados en el día 14 para estos grupos, mostrando ambos diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) con CTRL-S. Sin embargo, en los grupos HEP y BEM sí pudo observarse una clara tendencia hacia una disminución de la red vascular, mostrando un descenso aproximado en el recuento de vasos del 30% frente al tiempo anterior. Estos resultados intermedios entre los observados en CTRL-S y CTRL-D/PLCB fueron significativos ( $p \leq 0,05$ ) en todas las comparaciones entre HEP y BEM con el resto de los grupos.

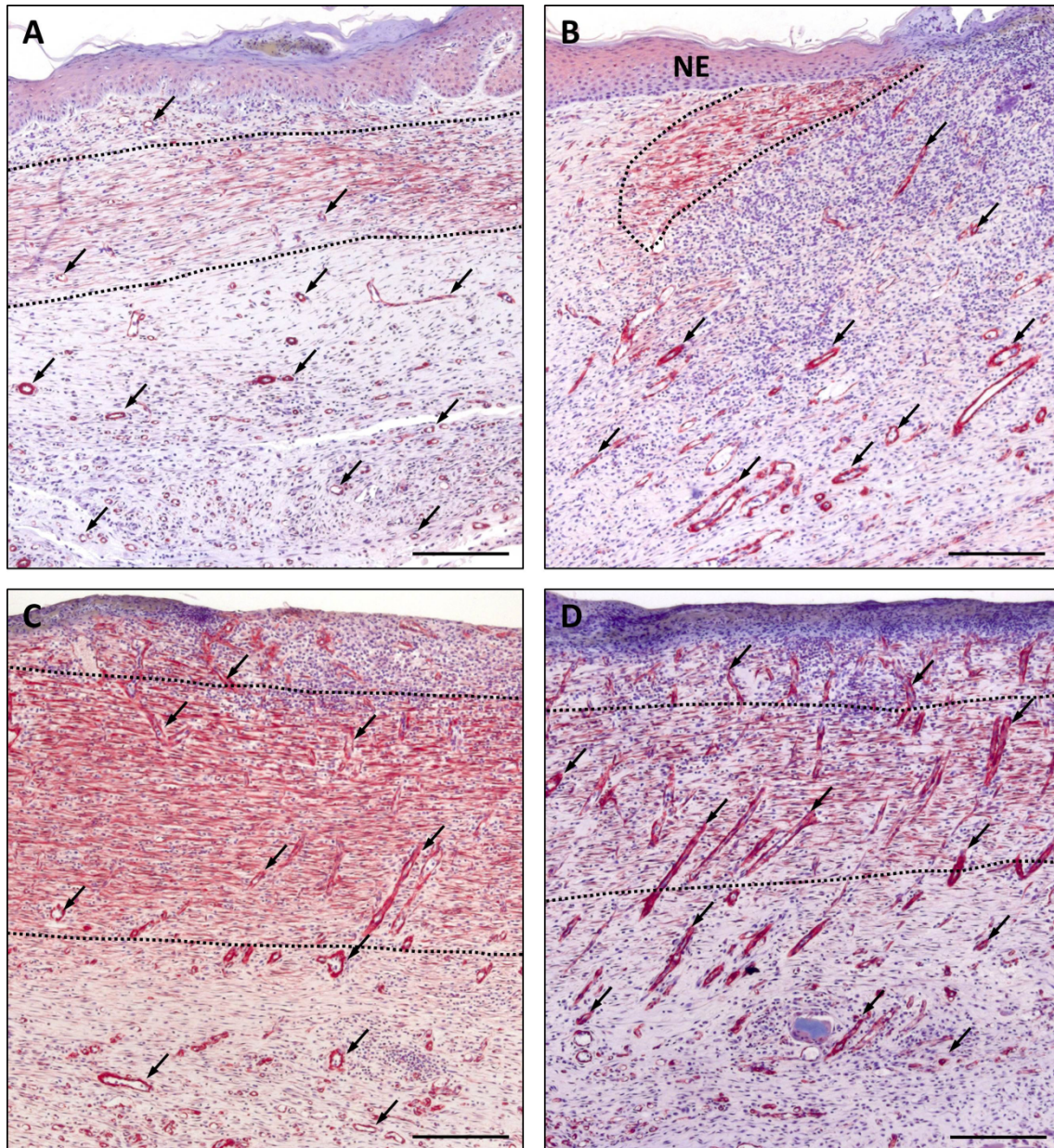




**Figura 38:** Inmunodetección de  $\alpha$ SMA (3d y 7d). **A)** MFbs alineados y detalle del marcaje. **B)** Tejido de granulación en grupo 7d-CTRL-D y detalle de vaso y MFbs. **C)** Franjas de MFbs (líneas de puntos) formadas sobre el músculo subyacente (**M**) en grupo 7d-HEP. Pueden verse múltiples vasos originándose a partir de esta zona. **D)** Borde del defecto en grupo 7d-HEP. Se observan MFbs (línea de puntos) en la interfaz dermis (**De**) - granulación (**TG**). **E)** Tejido de granulación en grupo 7d-BEM y detalle de vaso y MFbs. **F)** Marcaje en los estratos suprabasales (flecha) de los epitelios activos a día 3 (CTRL-D). Barras: 200  $\mu$ m.

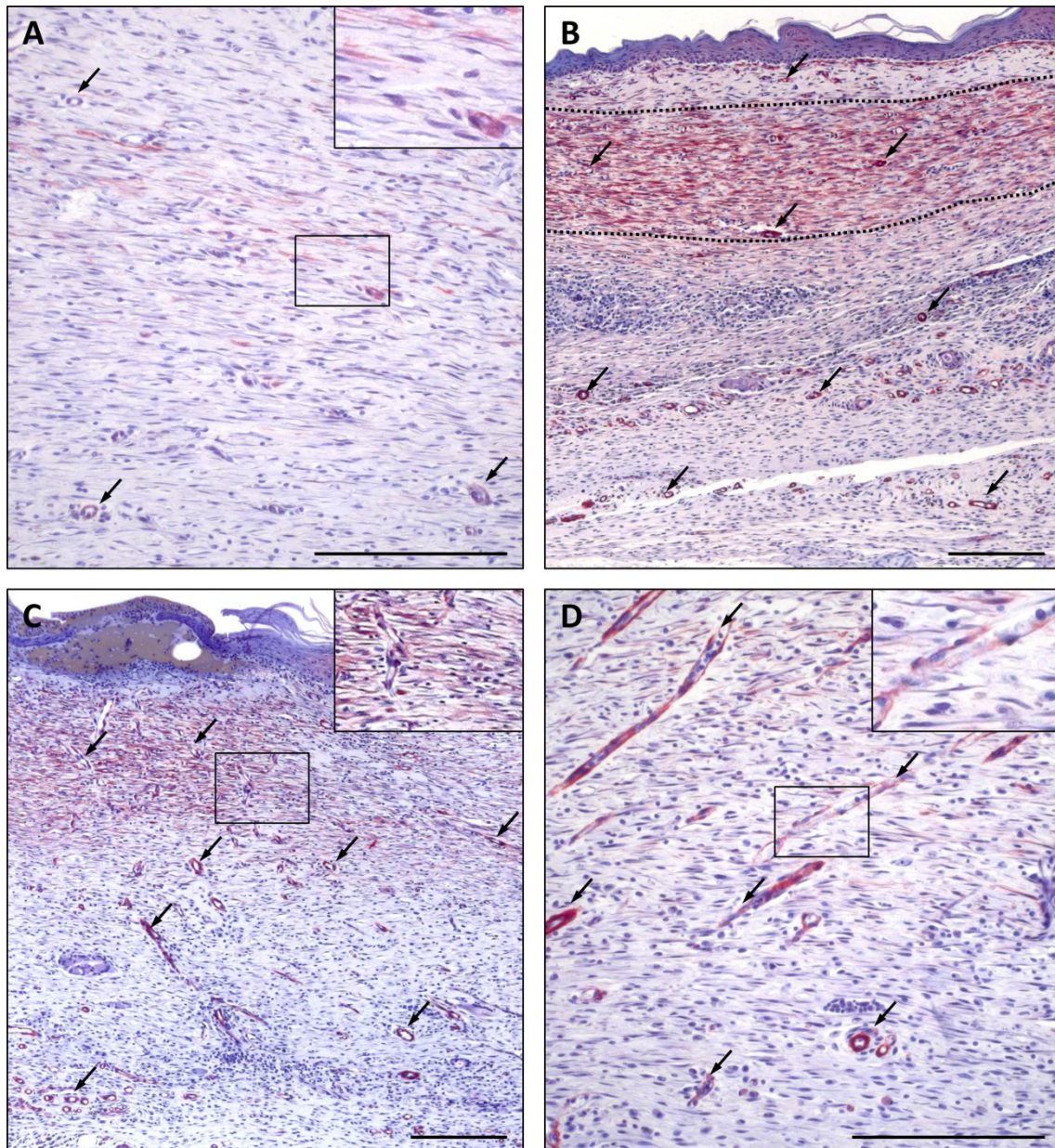


Los resultados de las valoraciones en el tejido de granulación de la neovascularización y de la presencia y organización de miofibroblastos se encuentran resumidos en la **Figura 41** y en la **Tabla 7** y **Tabla 8**, respectivamente.



**Figura 39:** Inmunodetección de  $\alpha$ SMA (14d). **A)** Presencia de MFbs y vasos en grupo CTRL-S. **B)** Borde del defecto en grupo PLCB. Puede verse marcaje epitelial ligero. **C)** Zona central del defecto en grupo CTRL-D. **D)** Tejido neoformado en grupo HEP. Líneas de puntos: zonas de MFbs. Flechas: vasos sanguíneos. Barras: 200  $\mu$ m.





**Figura 40:** Inmunodetección de  $\alpha$ SMA (21d). **A)** Tejido cicatrizal en grupo CTRL-S y detalle de la baja presencia de vasos y MFbs. **B)** Presencia elevada de MFbs (líneas de puntos) en el tejido cicatrizal en grupo CTRL-D. **C)** Tejido cicatrizal en grupo HEP y detalle de MFbs en zona central superior. **D)** Presencia de MFbs y vasos en grupo BEM y detalle de los mismos. Flechas: vasos sanguíneos. Barras: 200  $\mu$ m.

De manera adicional a estos estudios, pudo observarse en estas preparaciones un evidente marcaje de los estratos suprabasales de los epitelios activados, especialmente de los bordes de los frentes de avance. Este marcaje fue constatado en todos los grupos desde el primer tiempo de estudio, y fue gradualmente desapareciendo hasta el día 21, en el cual se observó tan solo en algunas muestras y de manera muy leve (**Figura 38D, F; Figura 39A, B**).

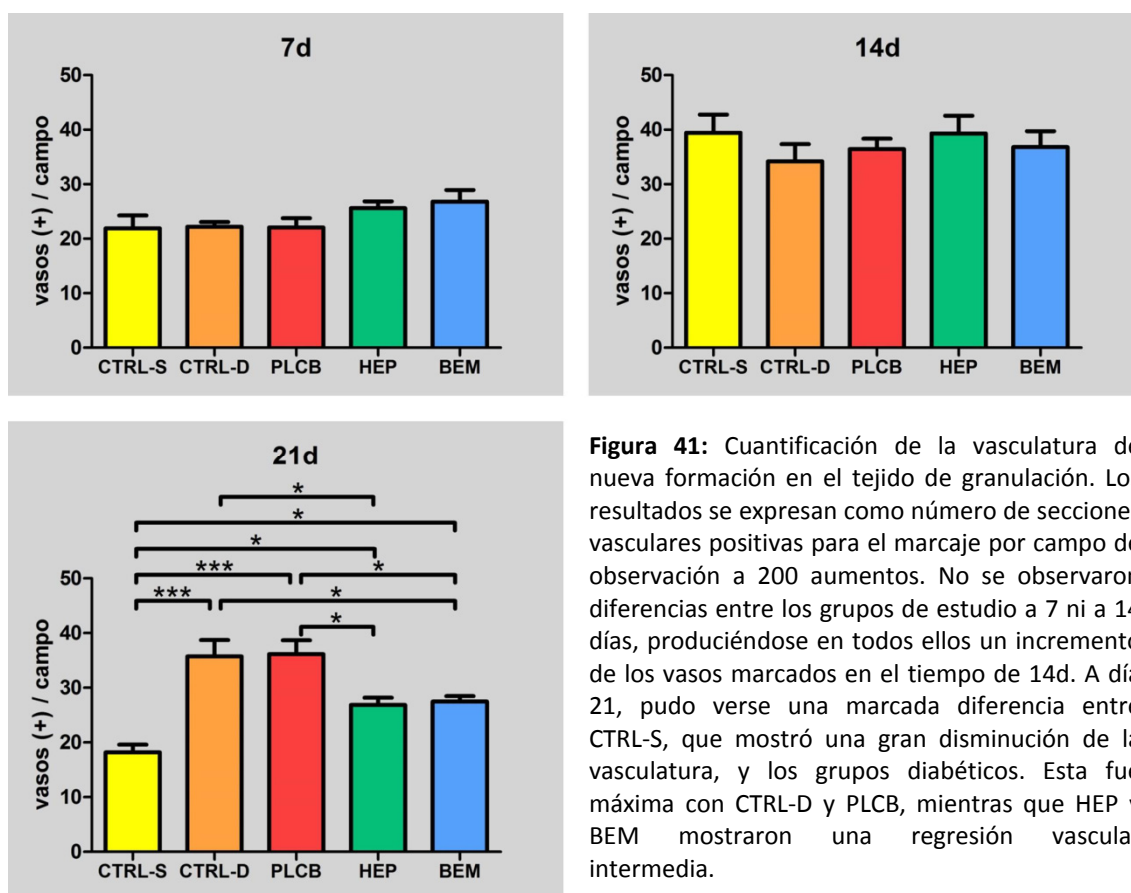
|        | 7d | 14d | 21d |
|--------|----|-----|-----|
| CTRL-S | ++ | ++  | -   |
| CTRL-D | ++ | +++ | ++  |
| PLCB   | ++ | +++ | +   |
| HEP    | ++ | +++ | +   |
| BEM    | ++ | +++ | +   |

**Tabla 7:** Valoración de la cantidad y densidad de miofibroblastos en el tejido neoformado. Resultados expresados como: (-) presencia muy baja; (+) presencia baja; (++) presencia media; (+++) presencia alta.

|        | 7d  | 14d | 21d |
|--------|-----|-----|-----|
| CTRL-S | +++ | +++ | +++ |
| CTRL-D | +   | +   | ++  |
| PLCB   | ++  | +   | ++  |
| HEP    | +++ | ++  | +++ |
| BEM    | +++ | ++  | +++ |

**Tabla 8:** Valoración de la organización de los miofibroblastos presentes en el tejido neoformado. Resultados expresados como: (+) baja; (++) media; (+++) alta.





#### 4.3.2 Análisis de la presencia de macrófagos y subpoblaciones macrofágicas

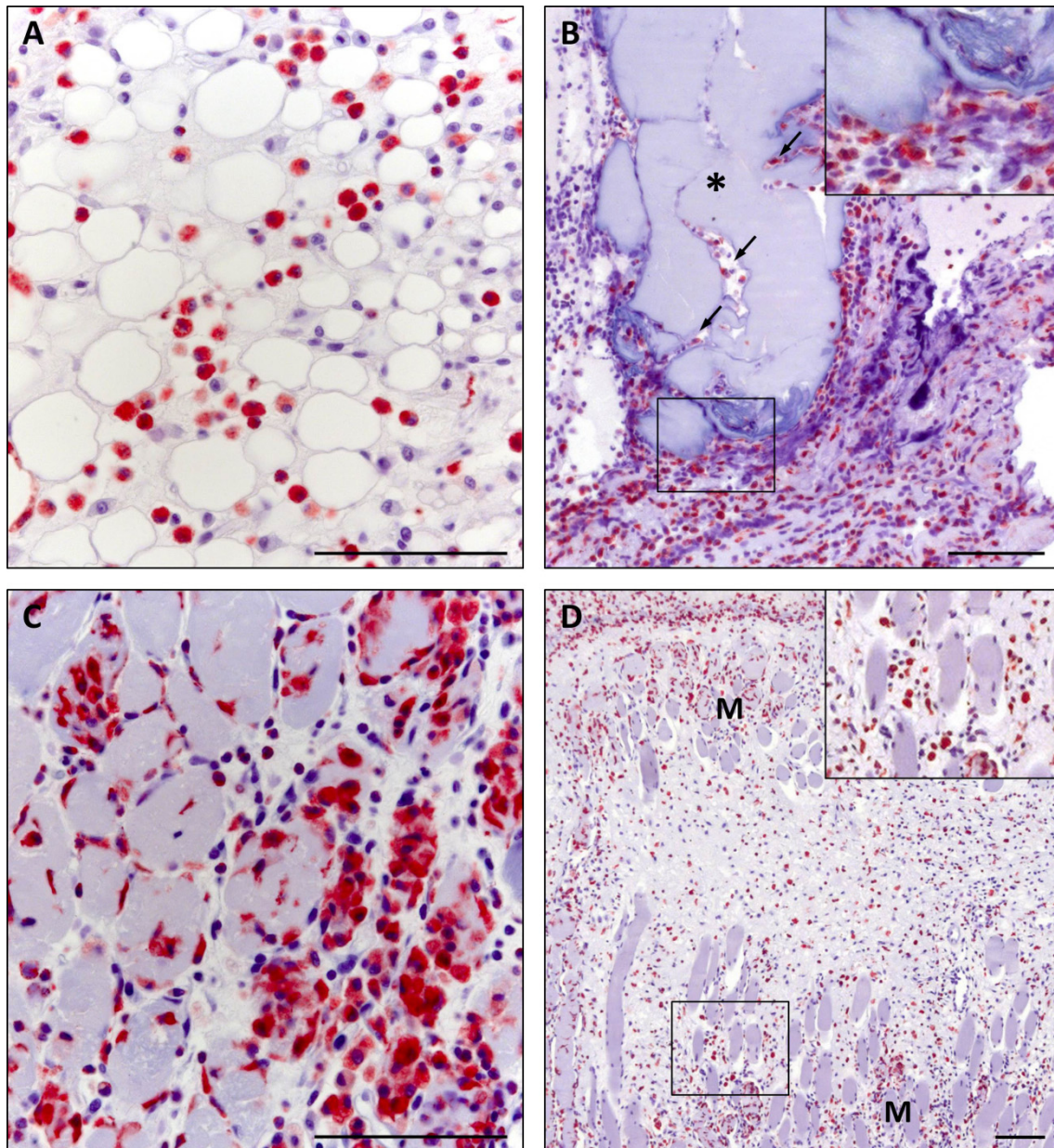
La observación de las muestras mostró presencia macrofágica en el tejido desde el primer tiempo de estudio (**día 3**), en el que pudo verse una gran cantidad de estas células en las zonas superficiales de exudado inflamatorio, así como en áreas edematosas más profundas y en los tejidos muscular y adiposo subyacentes (**Figura 42A**). En los restos de hidrogel presentes en la superficie de los grupos PLCB, HEP y BEM se observó un fuerte marcaje en las zonas en proceso de absorción a su alrededor y en su interior (**Figura 42B**). Asimismo, pudieron verse células marcadas asociadas a la presencia de cuerpo extraño, y en las zonas de músculo esquelético en reorganización, tanto infiltradas entre las fibras como invadiendo miocitos en degradación (**Figura 42C, D**). En número de macrófagos observados no presentó diferencias significativas entre los cinco grupos de estudio.

A **día 7**, todos los animales mostraron un elevado número de macrófagos en el tejido de granulación neoformado. Su distribución fue amplia, acompañando al resto del componente inflamatorio entre los nuevos vasos, en los exudados y edemas y participando en la reacción a cuerpo extraño (**Figura 43A, B**). Los fragmentos de hidrogel situados en el tejido de granulación mostraron una fuerte presencia de macrófagos y otras células inflamatorias en a su alrededor (**Figura 43C**). En la cuantificación a este tiempo de estudio, el grupo CTRL-S mostró un valor medio inferior al resto de grupos diabéticos, observándose una reacción inflamatoria menos intensa (**Figura 43D**). Los grupos CTRL-D, PLCB, HEP y BEM presentaron valores similares entre sí en cuanto a la presencia de macrófagos en este tiempo de estudio.

En las muestras a **día 14** los animales sanos mostraron remisión en la presencia de macrófagos, cuyo número se redujo en aproximadamente un 37% con respecto al tiempo anterior, siendo los lugares de reacción a cuerpo extraño los principales focos de presencia de estas células (**Figura 43E**). Por el contrario, los grupos diabéticos mostraron un aumento del número de macrófagos, especialmente en los grupos CTRL-D y PLCB (**Figura 43F; Figura 44A**), presentando diferencias significativas ( $p \leq 0,05$  y  $p \leq 0,01$ , respectivamente) frente al grupo CTRL-S. En los grupos HEP y BEM, la cantidad de macrófagos fue superior que la observada a día 7, aunque este aumento fue más moderado (**Figura 44B**). De manera general, la presencia de estas células fue especialmente intensa en las capas superficiales más inflamadas, mientras que en las zonas media y profunda la cantidad de macrófagos fue menos intensa.

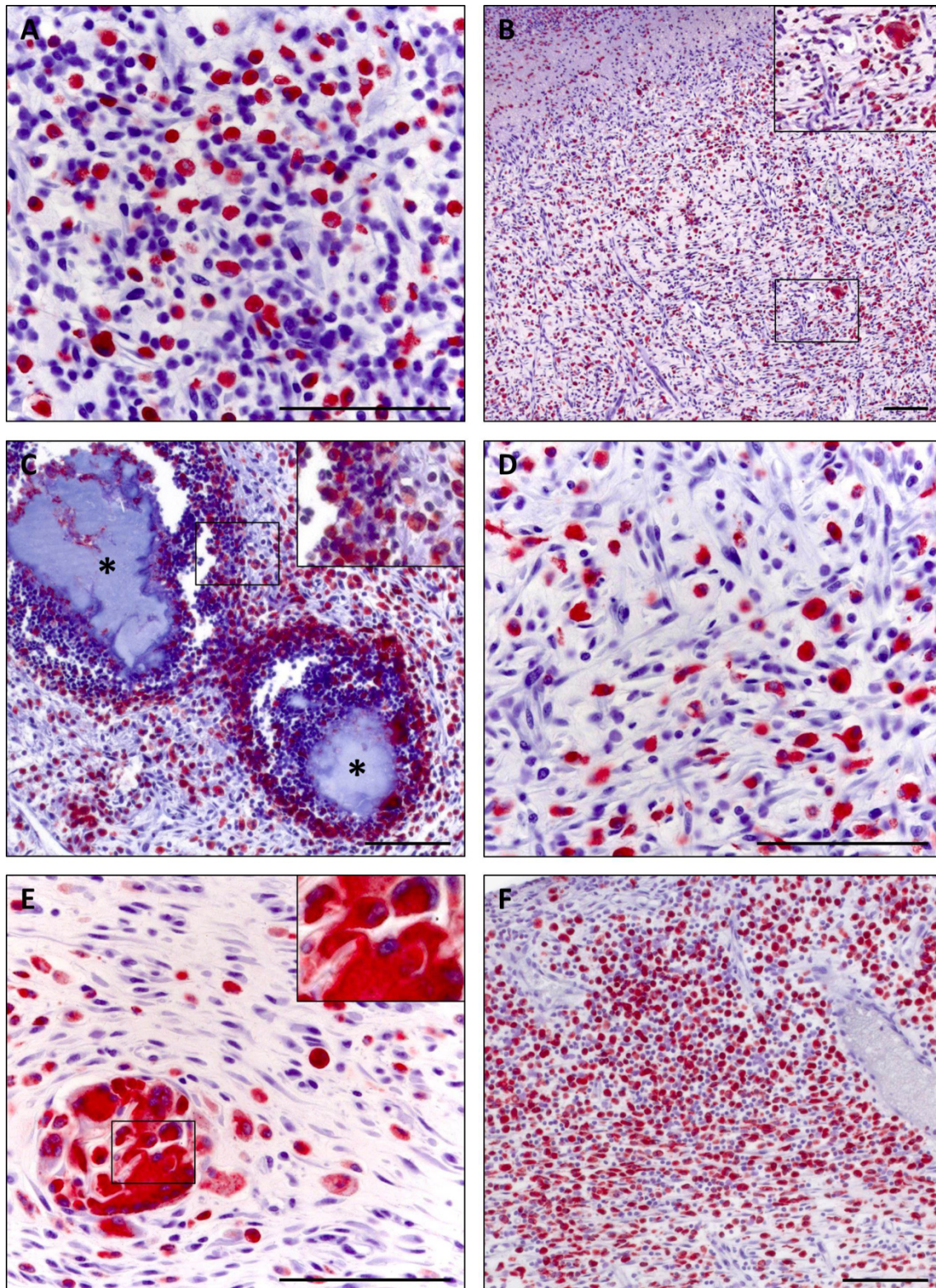
En el último tiempo de estudio, **21 días**, CTRL-S mostró una cantidad baja de macrófagos en el tejido cicatrizal, con valores de nuevo menores que los del tiempo anterior. Las capas superiores por regla general mostraron macrófagos dispersos, y la principal presencia se observó en las zonas con algún cuerpo extraño remanente y en la banda entre las zonas profunda y superior (**Figura 44C**). Las muestras de los grupos diabéticos presentaron una población macrofágica que, aunque se vio reducida con respecto al tiempo de estudio anterior, se mantuvo mucho más elevada que en los animales sanos, especialmente en el caso de CTRL-D ( $p \leq 0,05$  frente a CTRL-S). En este grupo, se observó un intenso marcaje en las bandas inflamatorias del tejido de granulación, en las zonas media y superficial, además de una presencia general por

todo el tejido (**Figura 44D**). Los grupos HEP y BEM mostraron menor inflamación que el control diabético. Los macrófagos marcados se distribuyeron de manera más homogénea por el tejido, aunque se observaron focos más intensos en algunas zonas inflamadas y en la interfaz entre las zonas profunda y superior (**Figura 44E, F**).



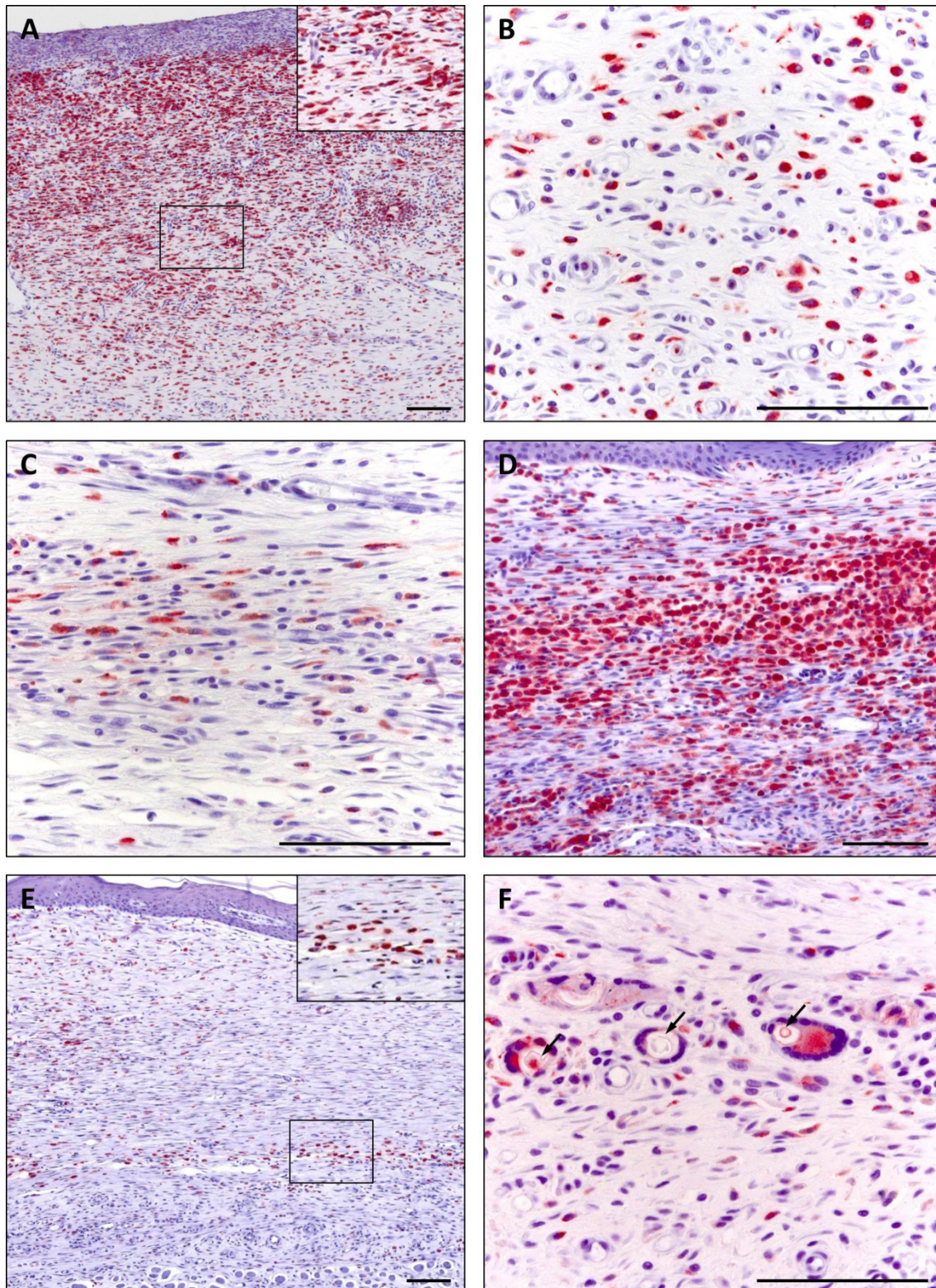
**Figura 42:** Marcaje inmunohistoquímico de macrófagos (I). **A)** Infiltración macrofágica a día 3 en el tejido adiposo en grupo CTRL-S. **B)** Hidrogel del grupo HEP (\*) y detalle del borde. Se observan macrófagos a su alrededor e infiltrados en su interior (flechas). **C)** Presencia de macrófagos en el tejido muscular. **D)** Presencia macrofágica en el tejido subyacente y detalle de la zona muscular (**M**). Barras: 100 µm.





**Figura 43:** Marcaje inmunohistoquímico de macrófagos (II). **A)** Elevada presencia de macrófagos y otras células inflamatorias a día 7 en grupo CTRL-D. **B)** Tejido de granulación en grupo HEP a día 7 y detalle del mismo. **C)** Restos de hidrogel (\*) PLCB a 7 y detalle del borde. Se observa presencia de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos a su alrededor. **D)** Infiltración macrofágica a día 7 en el grupo CTRL-S. **E)** Tejido neoformado en grupo CTRL-S y detalle de reacción a cuerpo extraño. **F)** Presencia de macrófagos en grupo 14d-CTRL-D. Barras: 100  $\mu$ m.





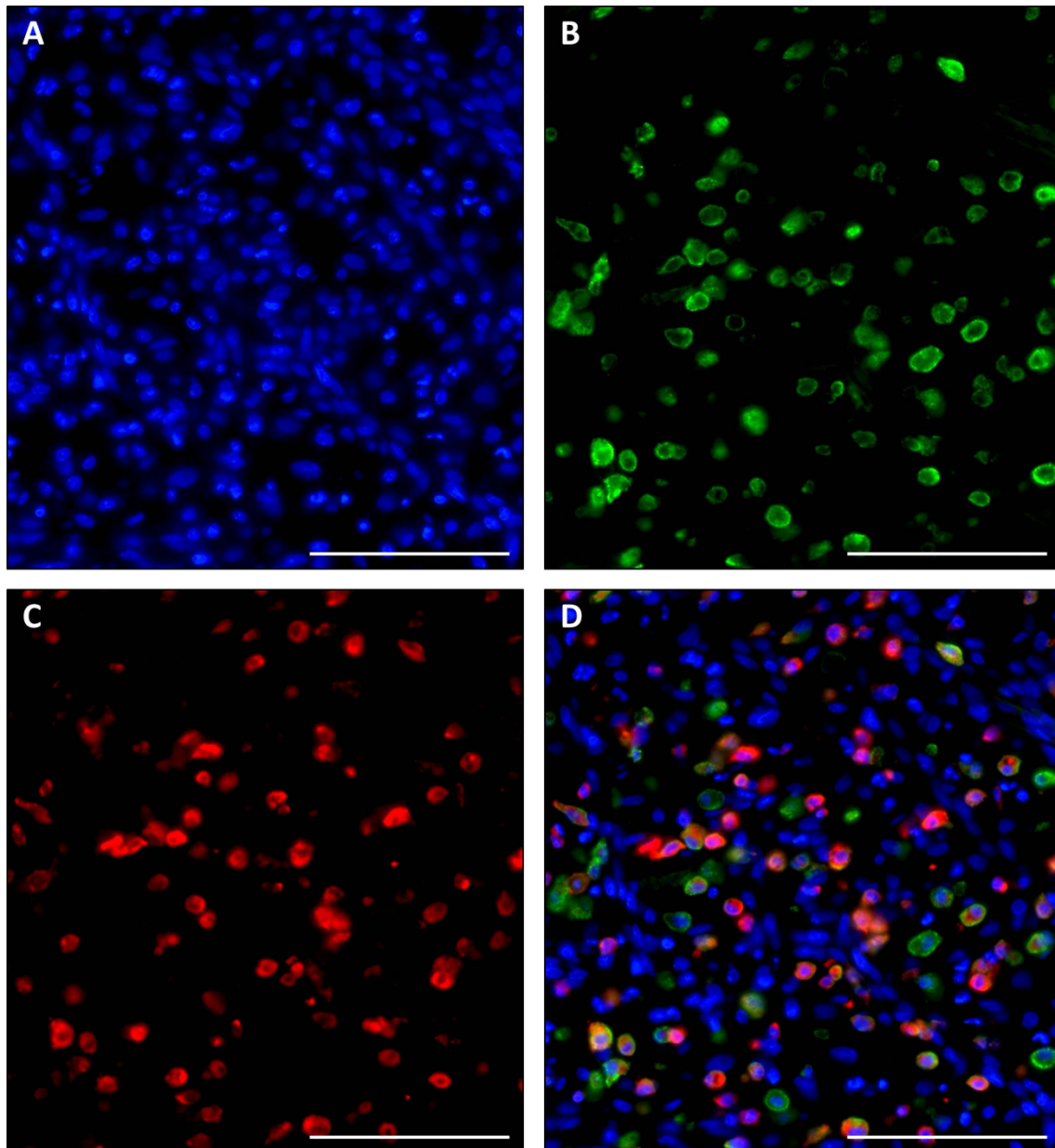
**Figura 44:** Marcaje inmunohistoquímico de macrófagos (III). **A)** Tejido inflamado en grupo 14d-PLCB y detalle de macrófagos marcados. **B)** Zona profunda del tejido en grupo 14d-HEP. **C)** Presencia de macrófagos en grupo CTRL-S a 21 días. **D)** Fuerte presencia macrofágica en grupo 21d-CTRL-D. **E)** Tejido cicatrizal a 21 días en grupo HEP y detalle de macrófagos sobre la capa inferior. **F)** Células gigantes de cuerpo extraño en respuesta a la presencia de fragmentos capilares (flechas) en el tejido de granulación. Barras: 100  $\mu$ m.



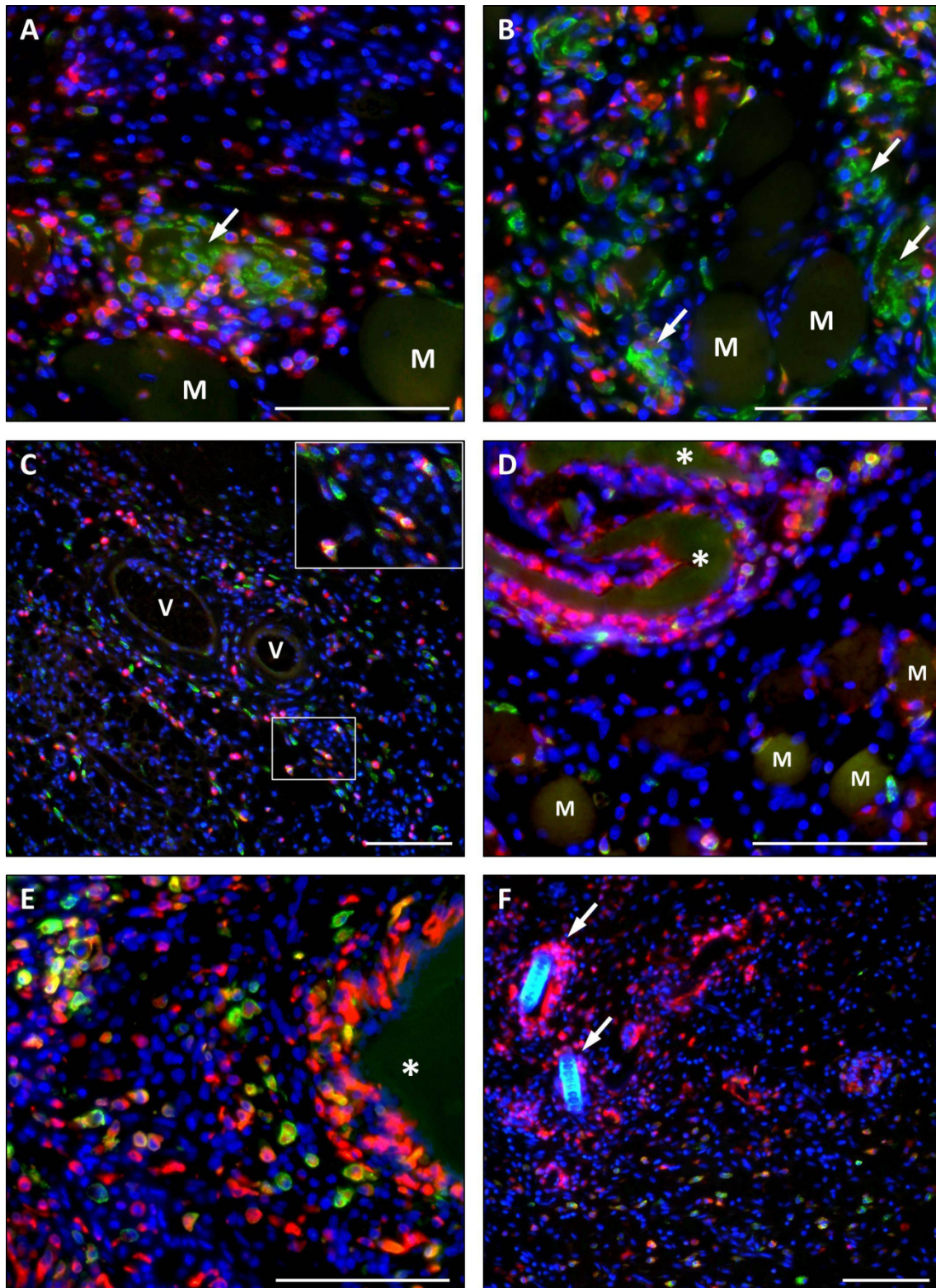
El estudio de las subpoblaciones macrofágicas mediante inmunomarcaje doble de CD68 y CD206 (**Figura 45**) mostró claras diferencias en su distribución y proporción a lo largo del tiempo, así como entre los distintos grupos de estudio. La presencia de macrófagos positivos para CD206, marcador asociado al fenotipo M2, fue muy elevada en las zonas de músculo en degradación/reorganización (**Figura 46A, B**). Este tipo también fue predominante en las zonas más profundas (**Figura 46C**), especialmente a tiempos largos, así como en las zonas intersticiales bajo los bordes y en la banda que separa las capas superior e inferior del tejido de granulación. Por el contrario, los macrófagos negativos para este marcaje fueron predominantes en las brechas entre borde y centro a tiempos cortos, y en general en las zonas con exudado inflamatorio y matriz provisional. Los macrófagos presentes en los bordes en degradación de los restos de hidrogel mostraron mayoritariamente un marcaje negativo para CD206 (**Figura 46D, E**). Su presencia también fue mayoritaria en la respuesta a cuerpo extraño (**Figura 46F**), especialmente en las zonas de contacto, incluyendo a las células gigantes sincitiales procedentes de la fusión de macrófagos que mostraron un evidente fenotipo no-M2 (**Figura 47A**).

El análisis de los distintos fenotipos, tanto de forma relativa como absoluta, mostró evidentes diferencias entre los grupos de estudio a partir del día 7. A la menor presencia de macrófagos totales observada en el grupo CTRL-S frente a los grupos diabéticos, se añadió un mayor número de macrófagos no-M2 en los grupos CTRL-D y PLCB ( $p \leq 0,01$  y  $p \leq 0,05$ , respectivamente) en comparación con el grupo sano (**Figura 47B, C**). La proporción de macrófagos M2 en el grupo CTRL-S fue muy superior (68,8%) a las de los grupos diabéticos, y dentro de ellos, HEP y BEM mostraron valores superiores (54,9% y 49,6%) a los de CTRL-D y PLCB (34,6% y 39,6%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Esta tendencia continuó a día 14, donde CTRL-D presentó una menor proporción de macrófagos CD206 positivos ( $p \leq 0,05$ ) que CTRL-S, HEP y BEM (**Figura 47D**). A día 21, los valores proporcionales de macrófagos M2 en los grupos CTRL-S, HEP y BEM mostraron porcentajes similares (56,6%, 56,9% y 56,8%), presentando diferencias estadísticamente significativas frente a CTRL-D (37,8%,  $p \leq 0,05$ ) y a PLCB (33,3%,  $p \leq 0,01$ ) (**Figura 47E, F**).

Los resultados de las cuantificaciones de macrófagos y sus subpoblaciones en los distintos tiempos de estudio se encuentran resumidos en las gráficas de la **Figura 48** y **Figura 49**.

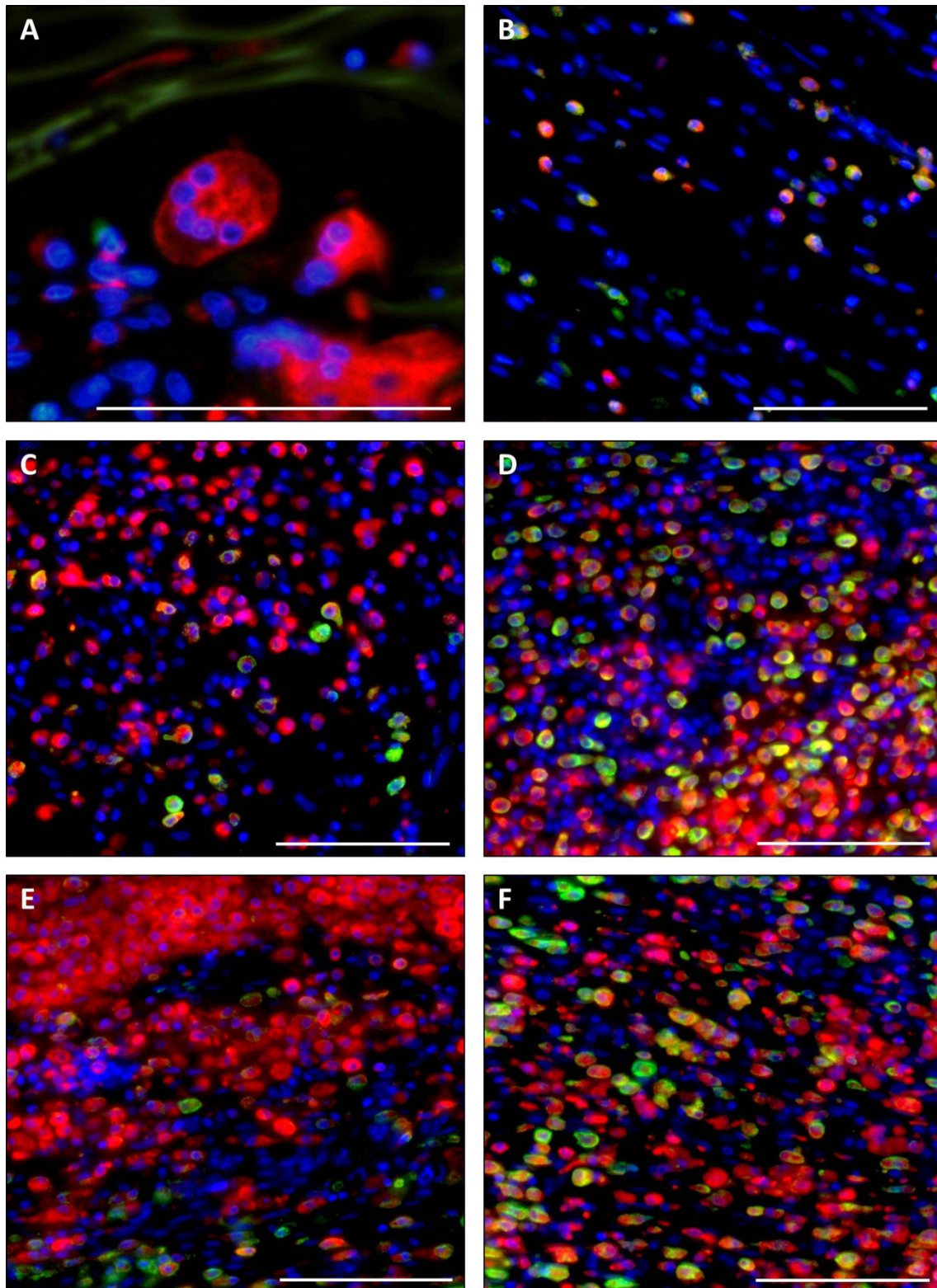


**Figura 45:** Inmunohistofluorescencia doble CD68/CD206. **A)** Marcaje nuclear con DAPI. **B)** Marcaje en verde del marcador CD206. **C)** Marcaje en rojo del marcador CD68. **D)** Superposición de los tres canales. La colocación de la fluorescencia verde y roja da lugar a un color amarillo/naranja, indicando células positivas para ambos marcadores. Barras: 100  $\mu$ m.

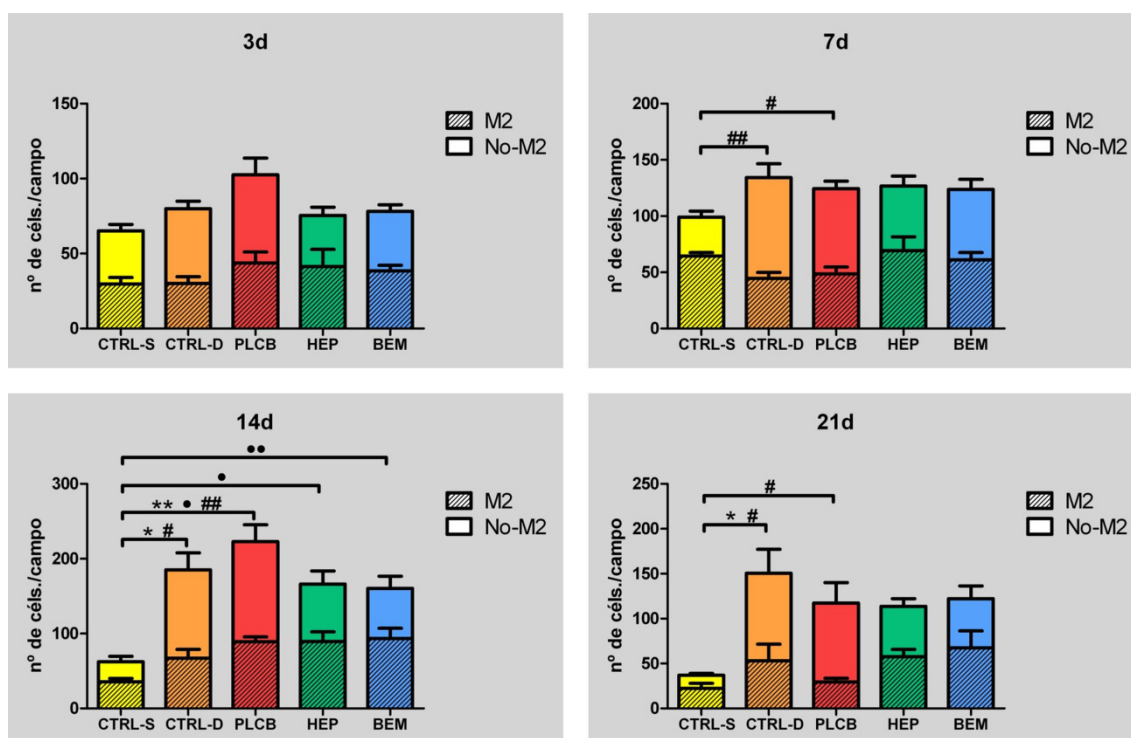


**Figura 46:** Inmunodetección de CD68 (rojo) y CD206 (verde) (I). **A, B**) Predominancia del fenotipo M2 en las fibras musculares en reorganización (flechas) **C**) Infiltración macrofágica en el tejido adiposo pardo a día 3 y detalle del marcaje. **D**) Restos superficiales de hidrogel HEP (\*) a día 3d, rodeados por macrófagos mayoritariamente negativos para CD206. **E**) Muestra 7d-BEM en la que se observan fragmentos de hidrogel (\*) en el tejido de granulación. Pueden verse macrófagos no-M2 en el borde y mayores proporciones de M2 en las zonas alejadas. **F**) La presencia de cuerpos extraños (flechas) provocó una respuesta macrofágica principalmente negativa para CD206. M: músculo. V: vaso sanguíneo. Barras: 100  $\mu$ m.

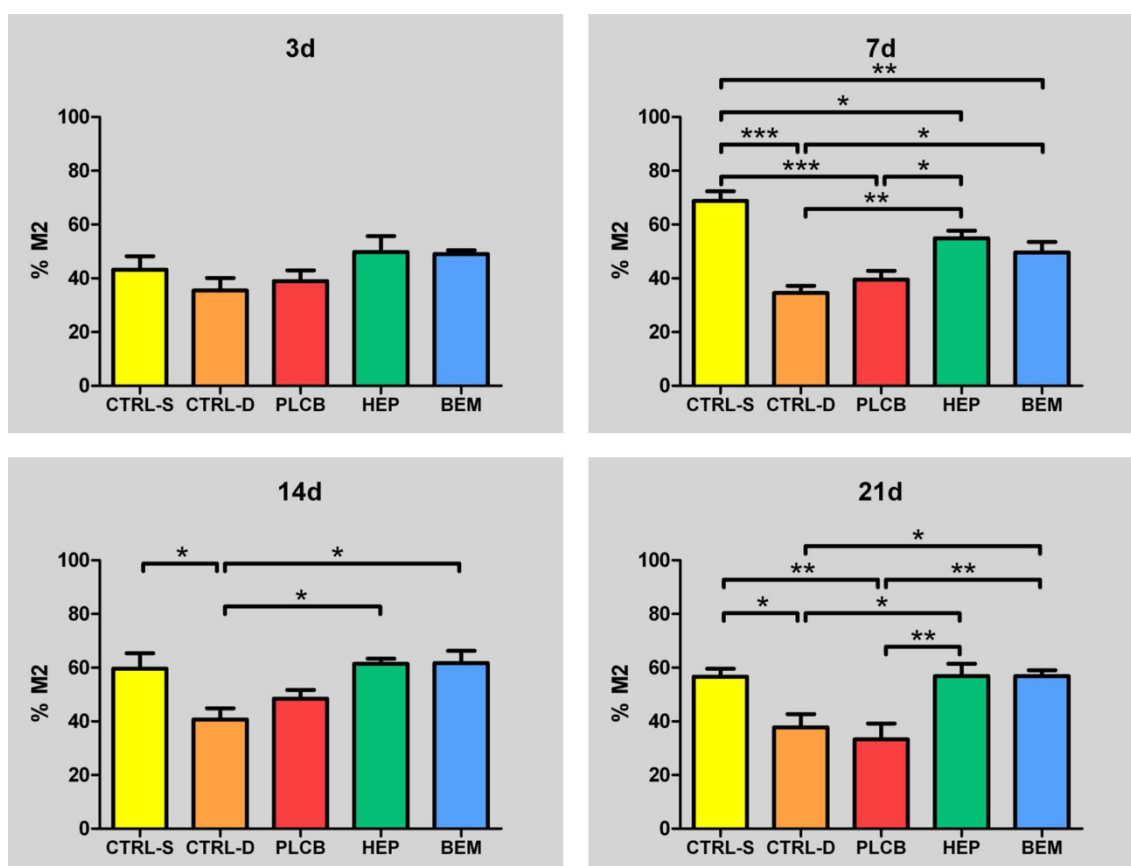




**Figura 47:** Inmunodetección de CD68 (rojo) y CD206 (verde) (II). **A)** Célula gigante de cuerpo extraño junto a un resto de astilla. Estas células mostraron de manera consistente un fenotipo no-M2. **B)** CTRL-S presentó a día 7 menor cantidad de macrófagos con mayoría CD206<sup>+</sup>. **C)** El grupo CTRL-D a 7 días mostró un bajo porcentaje del fenotipo M2. **D)** A día 14, el grupo CTRL-D presentó bajos porcentajes de macrófagos CD206<sup>+</sup>. **E)** Elevada inflamación con componente mayoritario no-M2 en grupo CTRL-D a día 21. **F)** A día 21, los grupos HEP y BEM (en la imagen) mostraron un elevado porcentaje de macrófagos M2. Barras: 100  $\mu$ m.



**Figura 48:** Cuantificación de macrófagos y sus subpoblaciones. Los resultados se expresan como número de células por campo de observación a 400 aumentos. (\*) macrófagos totales; (•) macrófagos M2; (#) macrófagos no-M2.



**Figura 49:** Proporción del fenotipo M2 en las poblaciones macrofágicas. Los resultados se expresan como porcentaje de macrófagos positivos para CD206 sobre el total de células CD68-positivas.

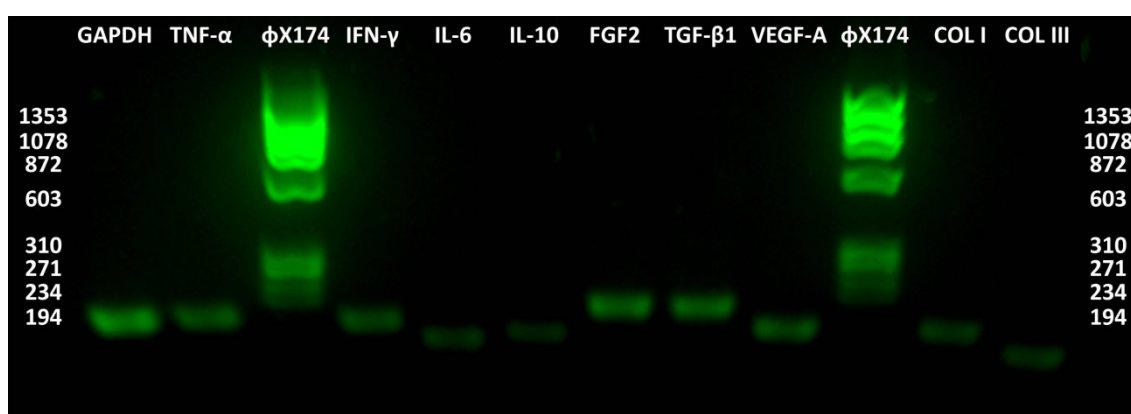


## 4.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

### 4.4.1 Validación de los cebadores diseñados

La especificidad y rendimiento de los pares de cebadores empleados en la qPCR fue evaluada atendiendo a sus valores de eficiencia en la amplificación, análisis de curvas de disociación y determinación del tamaño del producto de la reacción.

El análisis de las curvas estándar para cada par de *primers* permitió determinar y ajustar la eficiencia de la reacción, obteniéndose de manera general valores comprendidos dentro del rango 90 – 100%. Las curvas de disociación mostraron valores consistentes de la temperatura de desnaturalización para cada producto a lo largo de los distintos experimentos, sin observarse fenómenos de dimerización de cebadores capaces de interferir con la cuantificación de la expresión génica. La electroforesis en gel de agarosa realizada a partir de los productos de reacción permitió determinar el tamaño de las secuencias amplificadas, obteniéndose valores concordantes con los tamaños teóricos de los amplicones (**Figura 50**).

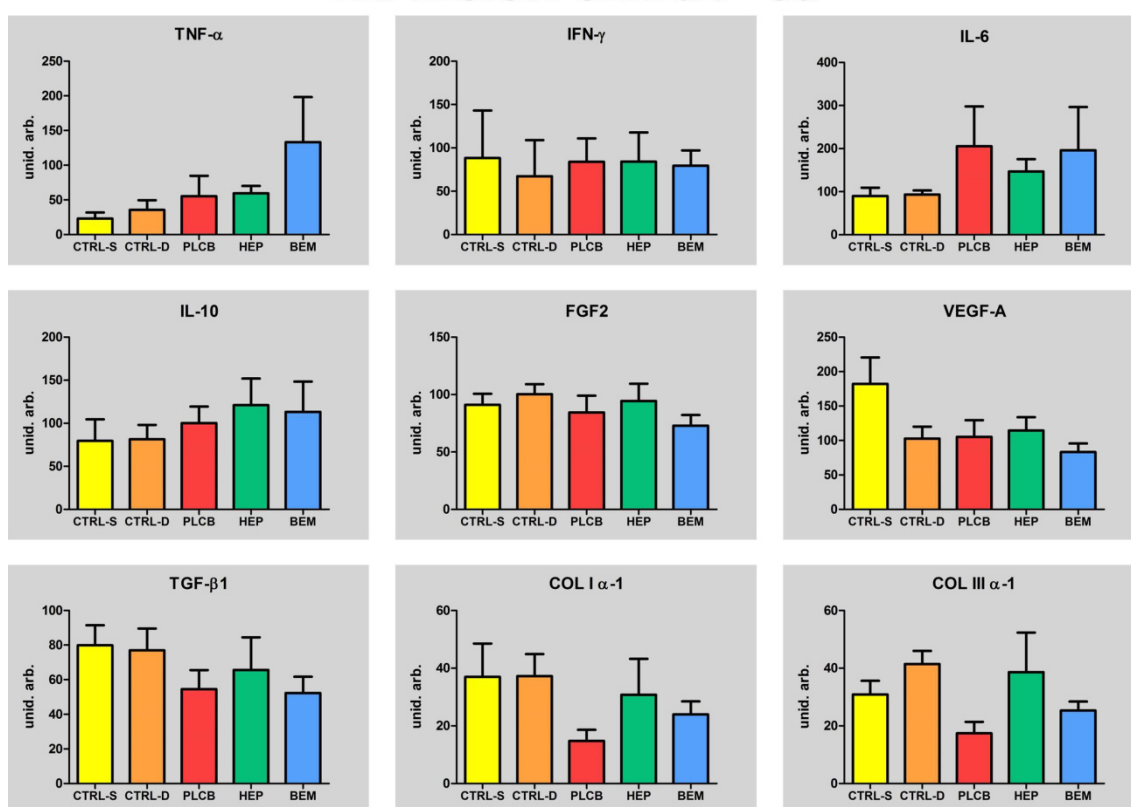


**Figura 50:** Electroforesis en gel de agarosa para la determinación del tamaño de los productos de la qPCR. Las calles 3 y 10 fueron cargadas con el marcador de peso molecular, cuyos tamaños de bandas se muestran en los laterales.

#### 4.4.2 Expresión de los genes de interés

Las muestras a **3 días** mostraron pocas diferencias entre los cinco grupos en la expresión de las cuatro citoquinas estudiadas, sin observarse patrones específicos. En el caso de los factores de crecimiento, el FGF2 y el TGF- $\beta$ 1 presentaron niveles de expresión similares en los cinco grupos de estudio, mientras que el VEGF-A mostró una mayor expresión en el grupo CTRL-S, aunque sin alcanzar la significatividad estadística. La expresión de los colágenos tipo I y III fue relativamente baja en todos los grupos de estudio, siguiendo ambos genes patrones de expresión similares (**Figura 51**).

### EXPRESIÓN GÉNICA – 3d

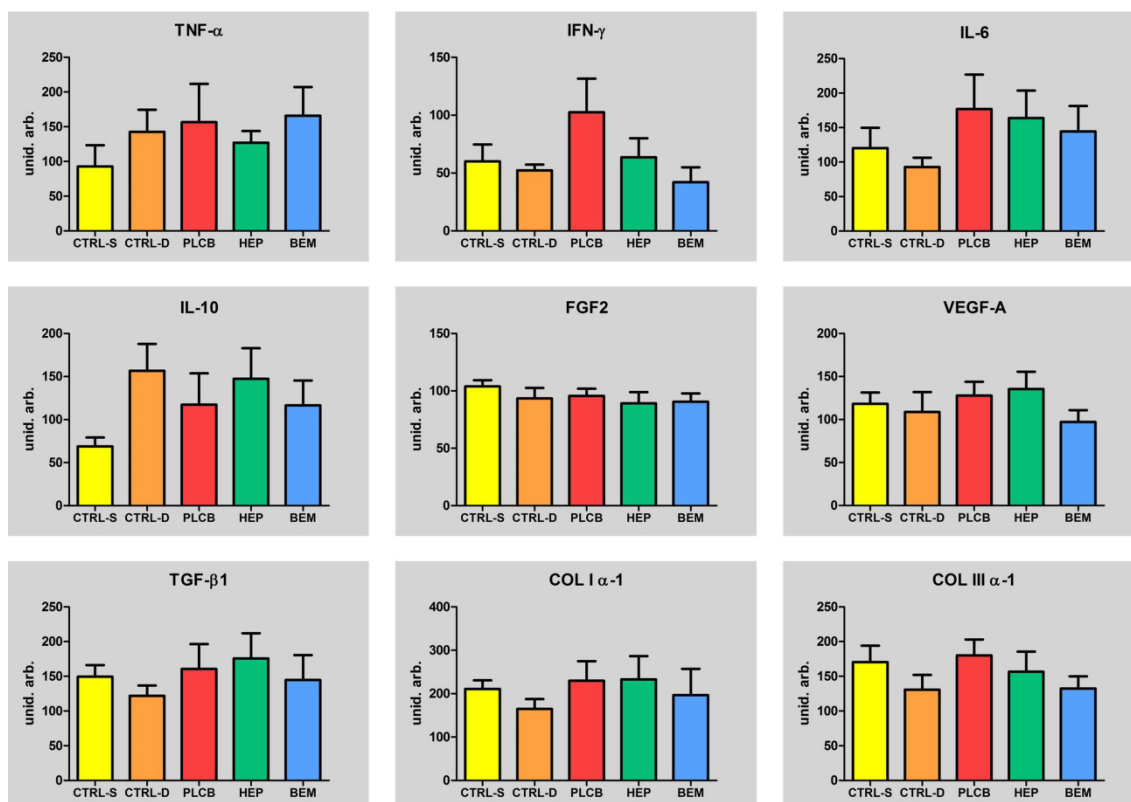


**Figura 51:** Niveles de mRNA a día 3 de los genes de interés cuantificados mediante qPCR. Los resultados se muestran normalizados frente al gen de referencia GAPDH y se expresan en unidades arbitrarias. El análisis estadístico se llevó a cabo a partir de la transformación logarítmica decimal de las distribuciones para su normalización.

A los **7 días**, el análisis de la expresión de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 no arrojó diferencias significativas entre los grupos, mostrando en todos los casos una gran variabilidad intragrupo. Los niveles de los factores de crecimiento analizados

fueron similares en los cinco grupos de estudio, así como en el caso de los colágenos I y III. Estos últimos mostraron un perfil de expresión en los cinco grupos muy similar en ambos casos, y a su vez parecido al que se observó en el caso del factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (Figura 52).

## EXPRESIÓN GÉNICA – 7d

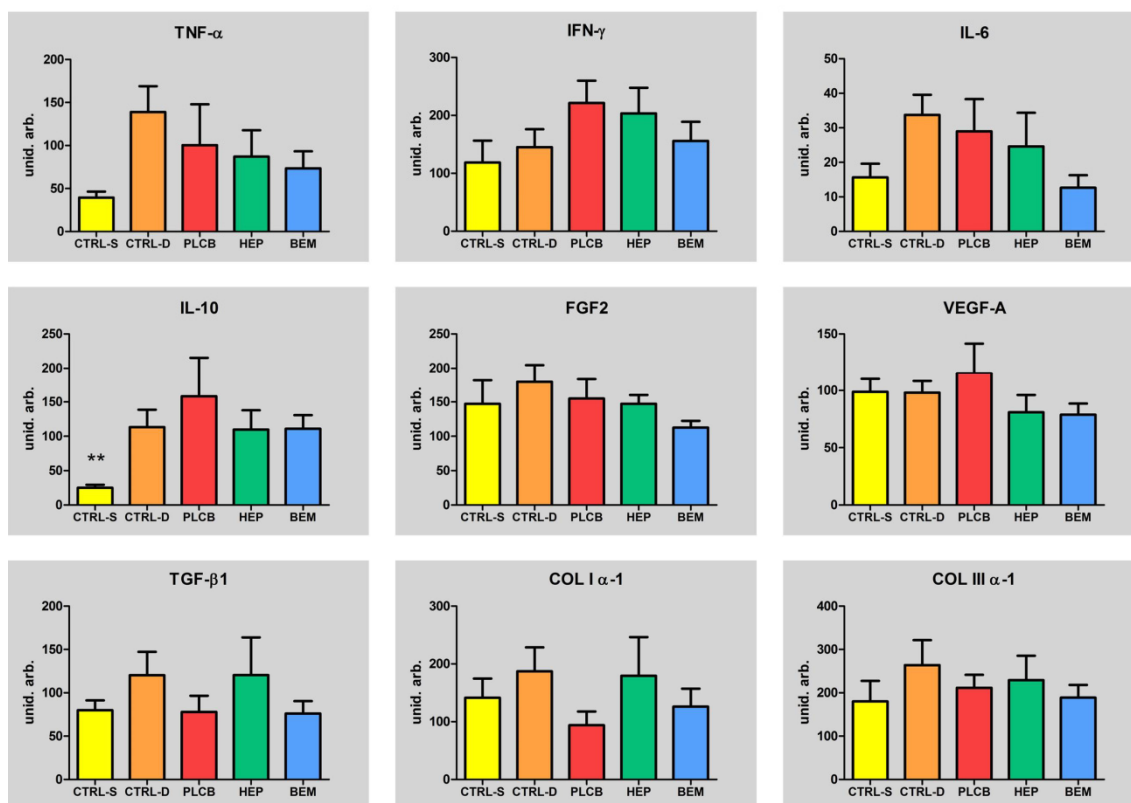


**Figura 52:** Niveles de mRNA a día 7 de los genes de interés cuantificados mediante qPCR. Los resultados se muestran normalizados frente al gen de referencia GAPDH y se expresan en unidades arbitrarias. El análisis estadístico se llevó a cabo a partir de la transformación logarítmica decimal de las distribuciones para su normalización.

En los resultados a **14 días** pudo observarse una continuación de la variabilidad observada previamente en la expresión de las citoquinas en los grupos diabéticos. Sin embargo, el grupo CTRL-S mostró de manera general unos niveles más bajos de estos mediadores, siendo este efecto especialmente notorio en el caso de la interleuquina-10. Estas diferencias no se observaron en los niveles de expresión de los factores de crecimiento FGF2 y VEGF-A, que mantuvieron la uniformidad entre los grupos observada en tiempos de estudio anteriores. Del mismo modo, tanto el TGF- $\beta$ 1 como

los colágenos tipo I y III volvieron a presentar un perfil de expresión entre los grupos muy similar, y menos homogéneo que FGF2 y VEGF-A (**Figura 53**).

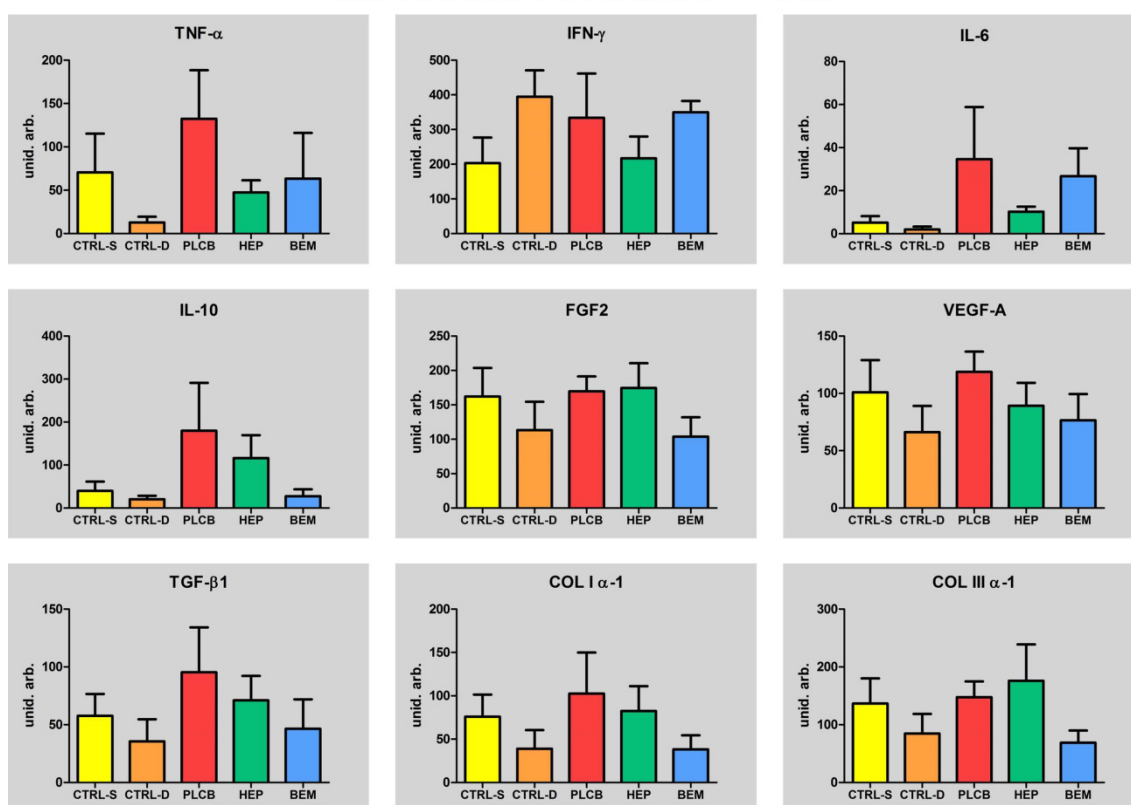
### EXPRESIÓN GÉNICA – 14d



**Figura 53:** Niveles de mRNA a día 14 de los genes de interés cuantificados mediante qPCR. Los resultados se muestran normalizados frente al gen de referencia GAPDH y se expresan en unidades arbitrarias. El análisis estadístico se llevó a cabo a partir de la transformación logarítmica decimal de las distribuciones para su normalización. (\*\*) CTRL-S vs. resto de grupos.

El último tiempo de estudio, **21 días**, mostró resultados poco homogéneos en la expresión de citoquinas. Aunque el IFN- $\gamma$  y la IL-6 continuaron sus tendencias al alza y a la baja, respectivamente, la IL-10 y sobre todo el TNF- $\alpha$  mostraron gran variabilidad, especialmente en los animales del grupo placebo. Los niveles de expresión de los factores de crecimiento FGF2, VEGF-A y TGF- $\beta$ 1 no mostraron diferencias significativas entre los grupos, aunque hubo una mayor disparidad que en tiempos anteriores. En este tiempo de estudio, se observó una menor expresión de ambos tipos de colágeno, así como una continuidad de la correlación con la expresión del TGF- $\beta$ 1 advertida en tiempos de estudio anteriores (**Figura 54**).

## EXPRESIÓN GÉNICA – 21d

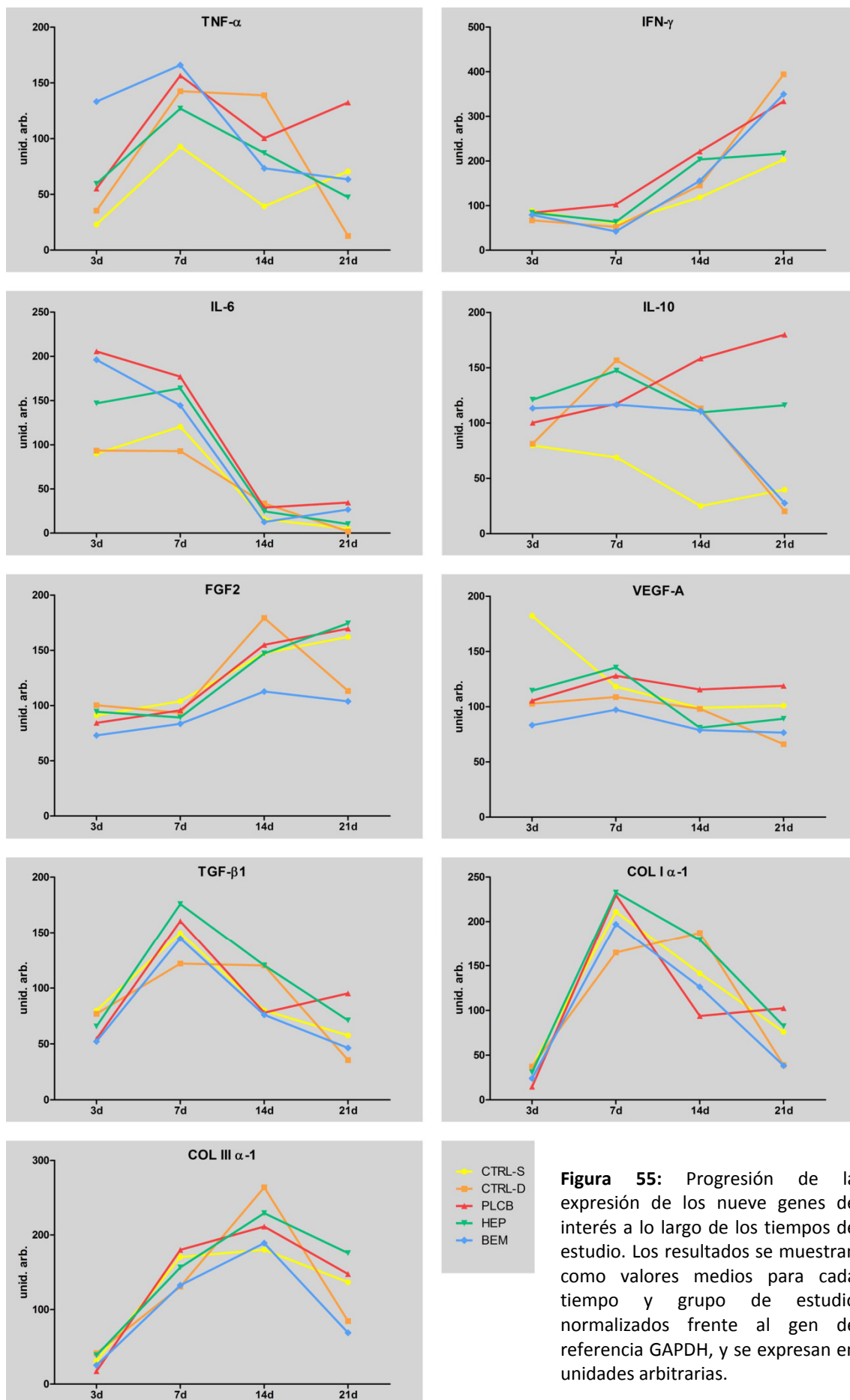


**Figura 54:** Niveles de mRNA a día 21 de los genes de interés cuantificados mediante qPCR. Los resultados se muestran normalizados frente al gen de referencia GAPDH y se expresan en unidades arbitrarias. El análisis estadístico se llevó a cabo a partir de la transformación logarítmica decimal de las distribuciones para su normalización.

A lo largo de los cuatro tiempos de estudio pudieron observarse diferentes tendencias en la expresión de los nueve genes estudiados (**Figura 55**).

Los niveles de TNF- $\alpha$  parecieron aumentar a los 7 días, aunque en tiempos posteriores su comportamiento no siguió un patrón claro entre los grupos. En cambio, los niveles de IFN- $\gamma$  fueron aumentando gradualmente de manera consistente a lo largo del estudio, obteniéndose los mayores valores a día 21. Por el contrario, la interleuquina 6 siguió un patrón inverso, con expresión elevada durante los días 3 y 7, reduciéndose en gran medida a día 14 y 21, llegando a niveles no detectables en algunos individuos. El comportamiento de la expresión de la IL-10 no siguió un patrón claro, mostrando tendencias poco definidas en los grupos diabéticos en contraste con el grupo CTRL-S, en el cual se observaron niveles generalmente menores con tendencia hacia una disminución de los valores a lo largo del tiempo.





**Figura 55:** Progresión de la expresión de los nueve genes de interés a lo largo de los tiempos de estudio. Los resultados se muestran como valores medios para cada tiempo y grupo de estudio normalizados frente al gen de referencia GAPDH, y se expresan en unidades arbitrarias.

La expresión de factores de crecimiento no mostró de manera general diferencias destacables entre los grupos, aunque sí se observaron diferencias en sus niveles a lo largo del tiempo. Mientras que el VEGF-A mostró niveles más o menos estables durante los cuatro tiempos de estudio, el FGF2 mostró una mayor expresión en los tiempos más avanzados. La expresión del TGF- $\beta$ 1, en cambio, alcanzó un máximo a día 7, momento a partir del cual fue reduciendo sus niveles paulatinamente.

En cuanto a la expresión de los genes de los colágenos tipo I y tipo III, ambos mostraron una expresión muy baja en el primer tiempo de estudio, para posteriormente alcanzar un máximo en los tiempos intermedios, tras lo que ambos sufrieron una bajada de los niveles de expresión génica.

#### 4.5 ESTUDIOS SEROLÓGICOS

La cuantificación de las concentraciones en sangre de las cuatro citoquinas estudiadas mostró niveles bajos de manera general en todos los grupos, demostrando en la casi totalidad de los individuos niveles por debajo de los límites de detección. Ninguna de las muestras analizadas presentó concentraciones de TNF- $\alpha$  superiores al límite de detección (4 pg/mL), mientras que en el caso del IFN- $\gamma$  únicamente un animal mostró niveles en sangre por encima del umbral para esta citoquina (13 pg/mL). Las interleuquinas 6 y 10 mostraron un comportamiento similar, rebasando los límites de detección (5 pg/mL en ambos casos) en tan solo 3 y 1 de los animales evaluados, respectivamente. En todos los casos, las muestras positivas estuvieron distribuidas en los grupos y tiempos de estudio sin un patrón.

Estos valores obtenidos por debajo de los límites de sensibilidad de los inmunoensayos empleados fueron equiparables a los niveles basales de animales sanos.



## DISCUSIÓN





## 5 DISCUSIÓN

### 5.1 COMPOSICIÓN Y ELABORACIÓN DE LOS HIDROGELES

El protocolo de fabricación desarrollado en este trabajo permitió la obtención de hidrogeles con unas propiedades adecuadas para su aplicación sobre defectos cutáneos, en cuanto a su estabilidad y facilidad de administración.

La concentración de quitosano empleada en la preparación del gel ha sido también usada por otros autores, dando buenos resultados en cuanto a aplicabilidad y eficacia (Alemdaroğlu y cols., 2006; Alsarra, 2009). Para conseguir la disolución del quitosano en polvo, es necesario que se produzca la protonación de los grupos amino, para lo que en este caso se empleó una solución de ácido acético. Una vez mezclados los ingredientes del gel, se realizó una neutralización del carácter ácido de la solución. Para aumentar el pH de las soluciones de quitosano y producir la gelificación, distintos autores han empleado estrategias como inmersión en NaOH (Aoyagi y cols., 2007) o vapores de  $\text{NH}_3$  (Ribeiro y cols., 2009). Este tipo de neutralización con compuestos potencialmente dañinos requiere un posterior lavado exhaustivo para evitar la presencia de restos de estas sustancias, lo que podría ocasionar una pérdida parcial del compuesto encapsulado. En el presente trabajo, la neutralización del ácido se llevó a cabo mediante la adición de  $\text{NaHCO}_3$ , un compuesto con capacidad tamponante, inocuo y presente de manera natural en el cuerpo. Aunque algunos trabajos describen aplicaciones de geles sin realizar neutralización (Alemdaroğlu y cols., 2006; Alsarra, 2009; Lee y cols., 2014), en el presente estudio se ha considerado necesario este paso para evitar un exceso de acidez en los apósitos aplicados a los defectos, puesto que podría resultar perjudicial para la cicatrización de los mismos. En la formulación del hidrogel se usaron carboximetilcelulosa y glicerol para incrementar la viscosidad y conseguir una mejor textura (Lee y cols., 2014), y se añadió metil-parabeno y propil-parabeno como preservantes (Alsarra, 2009).

Tanto el quitosano como las heparinas son dos polímeros cargados; el quitosano es un polímero ácido, cargado positivamente, mientras que la heparina es una molécula básica, con cargas negativas. Debido a las interacciones iónicas establecidas entre

ambos (Kamiński y cols., 2010) durante la formación del gel, la liberación de la heparina tiene lugar a medida que se va produciendo la degradación del hidrogel, asegurando una liberación sostenida en el tiempo, como ha sido comprobado en otros trabajos (Fujita y cols., 2004).

El entrecruzamiento químico de los hidrogeles es capaz de mejorar las propiedades mecánicas, y es frecuentemente utilizado en el diseño de distintos tipos de preparaciones. Sin embargo, tienen la contrapartida de ser menos citocompatibles, debido a la existencia de iniciadores de reacción tóxicos (Liang y Kiick, 2014). En este estudio se optó por la utilización de un hidrogel físico, ya que para su empleo como apósito cicatrizante la ausencia de toxicidad resulta imprescindible. A su vez, los hidrogeles obtenidos y empleados en este trabajo mostraron un buen comportamiento mecánico y una estabilidad adecuada aun careciendo de entrecruzamiento químico.

## 5.2 MODELO EXPERIMENTAL EMPLEADO

La cicatrización cutánea es un fenómeno extraordinariamente complejo, en el cual participan diferentes tipos celulares, moléculas de muy diversa índole y sobre el que influyen una gran variedad de factores, tanto intrínsecos al propio organismo como externos y/o ambientales. Debido a ello, su estudio, si bien resulta apasionante, conlleva grandes dificultades. La enorme cantidad de interacciones entre los mecanismos y procesos implicados en la reparación del daño tisular supone un importante desafío a la hora de investigar las funciones y efectos de cualquiera de los elementos participantes. Añadido a esto, la existencia de patologías que específicamente afectan a los procesos normales de cicatrización, como en el caso de la diabetes, añade un orden de complejidad adicional al estudio de la reparación cutánea (Stadelmann y cols., 1998; Burns y cols., 2003; Broughton y cols., 2006; Eming y cols., 2007a; Bao y cols., 2008; Menke y cols., 2008).

Aunque, como resulta obvio, la información más valiosa sobre los procesos de cicatrización para el ser humano es aquella obtenida a partir de investigaciones

centradas en nuestra propia especie, el estudio de la mayor parte de los mecanismos y fenómenos no es viable sin el empleo de **modelos animales** de cicatrización experimental. A lo largo de las últimas décadas, se han utilizado múltiples modelos diferentes, entre los que se incluyen los modelos con heridas dorsales en pequeños roedores, los defectos en oreja de conejo y, más recientemente, modelos porcinos de cicatrización (Dorsett-Martin, 2004; Galiano y cols., 2004a; Ansell y cols., 2012; Davidson y cols., 2013; Park y cols., 2014). Asimismo, aunque los estudios realizados *in vitro* han resultado útiles en ciertos aspectos, las grandes limitaciones debido a su excesiva simplicidad y alejamiento de las condiciones fisiológicas reales hacen que su valor como modelo resulte insuficiente para una gran parte de las investigaciones (Ansell y cols., 2012). Adicionalmente, durante los últimos años se han realizado aproximaciones matemáticas e *in silico*, intentando modelar los procesos de cicatrización normal y comprometida mediante algoritmos, simulaciones computacionales y modelos matemáticos (Vermolen y cols., 2006; Waugh y Sherratt, 2006; Mi y cols., 2007). Sin embargo, aunque en un futuro puedan suponer una muy potente herramienta para el estudio, la extraordinaria complejidad de los procesos, el gran número de factores implicados y el ingente número de sus interacciones, hacen que actualmente su utilidad sea muy limitada.

Sin lugar a dudas, los modelos más empleados para el estudio de la reparación cutánea son los basados en rata y ratón, debido a su fácil manejo y mantenimiento, abundancia y disponibilidad de cepas transgénicas (Werner y Grose, 2003; Dorsett-Martin, 2004; Eming y cols., 2007a; Ansell y cols., 2012). Ha de tenerse en cuenta, sin embargo, que el uso de estos animales plantea ciertas limitaciones debido a la existencia de algunas diferencias en los mecanismos de cicatrización con respecto al ser humano. De ellas, la más relevante es la gran participación del fenómeno de **contracción** que ocurre en los roedores, debido a la ausencia de fijación de la piel en estos animales y a la presencia de un panículo carnoso; mientras que en el caso del ser humano, en el que la piel se encuentra anclada a los tejidos subyacentes, las heridas tienden a cerrar principalmente por epitelización (Dorsett-Martin, 2004; Galiano y cols., 2004a; Bao y cols., 2008; Davidson y cols., 2013; Park y cols., 2014). No obstante, estas especies son las que se emplean más frecuentemente para el modelado de la cicatrización

comprometida por diabetes, para lo que se utilizan los ratones genéticamente deficientes (NOD y db/db) y la inducción de diabetes mediante estreptozotocina (STZ) (Ansell y cols., 2012; Wicks y cols., 2014).

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se escogió un **modelo de cicatrización en rata diabética inducida por estreptozotocina**, contando nuestro grupo de investigación con amplia experiencia en su empleo (Gimeno y cols., 2003; García-Esteo y cols., 2005; García-Esteo y cols., 2007). La destrucción selectiva de las células  $\beta$  del páncreas permite el desarrollo de una patología diabética tipo I, produciendo en los animales una elevada concentración de glucosa en sangre en un corto periodo de tiempo. Puesto que la mayoría de las complicaciones en los procesos cicatrizales diabéticos son causadas por los procesos de glicación inespecíficos, acumulación de AGEs y estrés oxidativo asociados a la hiperglucemia (Singh y cols., 2001; Ahmed, 2005; Brownlee, 2005; Berlanga y cols., 2005; Broughton y cols., 2006; Goldin y cols., 2006; Bao y cols., 2008; Berlanga-Acosta y cols., 2010; Brouwers y cols., 2011), la diabetes experimental inducida por STZ resulta una valiosa herramienta para el estudio de la reparación cutánea comprometida por diabetes. La comprobación de su inducción en nuestro modelo, realizada a diferentes niveles, demostró un claro desarrollo de la patología. La observación y control de los animales a lo largo del tiempo de estudio permitió comprobar la aparición de los síntomas clásicos de la diabetes, tales como la polidipsia, polifagia y poliuria, así como la presencia de altas concentraciones de glucosa en orina. De manera adicional, el desarrollo de cataratas por parte de algunos animales diabéticos resulta también consecuente con la hiperglucemia diabética (Singh y cols., 2001; Ahmed, 2005). Tras la aparición de la enfermedad, los animales diabéticos sufrieron un importante retraso en el aumento de peso con respecto a los controles sanos, debido al perfil catabólico asociado a la insuficiencia insulínica. Además, se observaron importantes cambios morfológicos en los animales durante el desarrollo del estudio, mostrando un excesivo engrosamiento de la zona abdominal. Las necropsias realizadas sobre estos animales permitieron constatar la existencia de una importante hiperplasia del tubo digestivo, así como la desaparición de los depósitos de grasa corporal abdominales y subcutáneos. Puesto que en estos animales una gran parte de su masa corporal correspondía a los intestinos y su contenido, resulta muy

probable que las diferencias en el estado metabólico y fisiológico de los animales diabéticos fuera muy superior a la inferida a partir de las variaciones en el peso, ya de por sí significativas. Como validación adicional de la diabetes experimental, el análisis histológico de los páncreas mostró una clara alteración de los islotes de Langerhans, sin observarse diferencias en la parte exocrina del órgano, lo que permitió constatar la toxicidad selectiva de la estreptozotocina (Tesch y Allen, 2007).

La elección de un **defecto excisional** de grosor total como modelo de cicatrización fue debido a varias razones. En primer lugar, los defectos excisionales con curación por segunda intención permiten una investigación de los procesos cicatrizales mucho más profunda que las heridas incisas de cierre por primera intención, ya que en estas últimas la aproximación de bordes y la ausencia de pérdida tisular no estimulan la completa activación de los mecanismos reparativos de la piel (Miao y cols., 2012). Por el contrario, una lesión excisional de grosor total necesita recorrer todas las fases y estadios del proceso reparativo, permitiendo la observación de los mecanismos y la identificación de posibles problemas, retrasos o fallos en el proceso. Por otro lado, las lesiones cutáneas más relevantes en pacientes diabéticos son las úlceras, cuya fisiología y morfología (destrucción tisular, tamaño, etc.) las hacen mucho más similares a un defecto excisional que a una herida incisional.

### 5.3 EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL PROCESO DE CICATRIZACIÓN

El seguimiento macroscópico de la evolución de los defectos permitió observar un patrón de comportamiento similar en los cinco grupos de estudio, aunque con diferencias en su desarrollo temporal.

En un primer momento, el defecto realizado en el dorso de las ratas mostró una importante distensión inmediatamente después de retirar la zona de piel marcada, ocurriendo de manera similar en todos los grupos de estudio. El área inicial sufrió un incremento medio del 19,4% frente al área teórica, lo que puso de manifiesto las fuerzas de tensión a las que, en condiciones normales, está sometida la piel. La



ausencia de anclaje en la piel de las ratas es posiblemente la razón de esta gran distensión, puesto que una vez ausente esa porción cutánea, los bordes del defecto se ven arrastrados centrífugamente al haber desaparecido las fuerzas de tensión del tejido retirado y no existir uniones que impidan su desplazamiento (Ansell y cols., 2012; Davidson y cols., 2013).

Al analizar el primer tiempo de estudio, 3 días tras la realización del defecto, pudo observarse un tamaño de herida mayor que el inicial en la mayoría de los animales, debido posiblemente a los factores descritos anteriormente. La observación histológica de las muestras permitió constatar la activación de los mecanismos reparativos, que en este tiempo temprano se centraron en la estabilización de los bordes mediante el sellado del tejido expuesto y en el desarrollo de una respuesta inflamatoria elevada, como ha sido descrito (Broughton y cols., 2006; Li y cols., 2007; Eming y cols., 2007a; Gurtner y cols., 2008; Lucas y cols., 2010; Wicks y cols., 2010). Aunque no se vio avance epitelial en el análisis macroscópico, la evaluación histológica mostró que los bordes epidérmicos ya se encontraban activados, habiendo comenzado la migración y proliferación, como se expone más adelante.

A medida que avanzaron los tiempos de estudio se observó un retraso en el cierre en los animales diabéticos, efecto que ha sido descrito en diversos estudios y modelos (Mi y cols., 2007; Mirza y Koh, 2011; Miao y cols., 2012). El tratamiento con hidrogeles funcionalizados con ambos tipos de heparina favoreció una respuesta intermedia entre los grupos control sano y diabético en los tiempos centrales. Sin embargo, en el último tiempo de estudio los cinco grupos mostraron un cierre macroscópico comparable entre ellos en cuanto a su tamaño. Esta ausencia de diferencias, especialmente entre los grupos CTRL-S y CTRL-D resulta extraña en un primer momento, teniendo en cuenta las deficiencias asociadas a la cicatrización diabética de sobra documentadas (Greenhalgh, 2003; Jeffcoate y Harding, 2003; Falanga, 2005; Broughton y cols., 2006; Bao y cols., 2008). Sin embargo, este efecto a largo plazo ha sido observado en otros estudios con modelos similares (Michaels y cols., 2007; Nishikori y cols., 2014; Okizaki y cols., 2015) ¿A qué fue debida, entonces, esta aparente ausencia de efecto de la patología sobre la cicatrización?

La evaluación histológica de las muestras, así como la valoración de la morfología y evolución de los animales permitió plantear una explicación plausible a esta cuestión. Tanto en el grupo CTRL-D como en PLCB, la evolución del peso muestra un descenso en el último tiempo de estudio, mientras que los animales sanos y los tratados con hidrogeles con heparina y bemiparina continuaron con la tendencia de recuperación de peso tras la realización del defecto. En efecto, en aquellos dos grupos los animales mostraron una extrema delgadez, especialmente notoria en la zona torácica. Esta pérdida de masa corporal ya resulta de por sí significativa, siendo indicativa de problemas en la reparación de una lesión (Werner y Grose, 2003; Park y cols., 2014). Paralelamente, el grosor del tejido de granulación medido al final del estudio en CTRL-D y PLCB fue marcadamente inferior al de los otros tres grupos, presentando también otras alteraciones que se comentarán en profundidad más adelante. Puesto que la mayor contribución al cierre de la herida en los roedores proviene del fenómeno de contracción (Galiano y cols., 2004a; Bao y cols., 2008; Nishikori y cols., 2014; Park y cols., 2014), y así fue constatado en nuestro estudio, cabe plantearse que las similitudes en los porcentajes de cierres provengan del hecho de que aquellos animales que presentaron deficiencias en el proceso cicatrizal tuvieran, de alguna manera, cierta facilidad a la hora de contraer la herida. La menor circunferencia torácica, unida a la laxitud y delgadez de la piel en los animales de los grupos CTRL-D y PLCB probablemente provocaran una menor resistencia a la contracción, debido a la existencia de menores tensiones de resistencia a la tracción por parte de la piel. De esta manera se explicaría cómo los tejidos de granulación de estos grupos, de grosor claramente menor a los de CTRL-S, HEP, y BEM, fueron capaces de lograr unos resultados de contracción equiparables. Las observaciones sobre la morfología del cierre parecen apoyar esta teoría, ya que los defectos en CTRL-D y PLCB mostraron cierres ojivales, con predominancia de contracción sobre el eje transversal. Según este planteamiento, la resistencia mecánica en ese eje resultaría menor en esas condiciones, mientras que la contracción longitudinal no se vería tan facilitada. De manera adicional, las valoraciones cualitativas extraídas de la propia manipulación y procesamiento de las muestras para la realización de las técnicas indicaron la existencia de un tejido débil y poco resistente, probablemente más susceptible a sufrir recidivas. Para confirmar estas hipótesis, resultaría de gran interés la realización de estudios

posteriores tensiométricos, valorando las propiedades de resistencia mecánica y la capacidad contráctil del tejido de granulación (Hinz y cols., 2001; Dovi y cols., 2003; Corr y Hart, 2013; Chen y cols., 2014).

## 5.4 COMPONENTE INFLAMATORIO

Uno de los principales problemas asociados a la cicatrización diabética es la falta de progresión y el estancamiento en una inflamación crónica (Komesu y cols., 2004; Ahmed, 2005; Goldin y cols., 2006; Bao y cols., 2008; Wicks y cols., 2014), por lo que el estudio de la evolución del componente inflamatorio resulta de gran importancia para la valoración de la efectividad de los hidrogeles empleados. De los tipos celulares implicados, tres de los más importantes son los neutrófilos, los macrófagos y los mastocitos (Park y Barbul, 2004; Martin y Leibovich, 2005; Eming y cols., 2007a; Wilgus, 2008; Koh y DiPietro, 2011). El análisis de la evolución de las poblaciones de estas células del sistema inmune mostró diferencias entre los grupos de estudio a lo largo del tiempo, con importantes implicaciones en la progresión del defecto.

Frente al proceso normal de cicatrización observado en los animales sanos, los grupos diabéticos mostraron una mayor presencia de neutrófilos en el tejido cicatrizal, así como una permanencia más prolongada en la herida. Esta inflamación sostenida asociada a la diabetes ha sido extensamente descrita en la literatura (Wetzler y cols., 2000; Singh y cols., 2001; Komesu y cols., 2004; Ahmed, 2005; Eming y cols., 2007a; Peppas y cols., 2009; Xu y cols., 2013), considerándose uno de los principales problemas con los que se ha de lidiar para lograr alcanzar la cicatrización de este tipo de heridas. La mejora observada en los grupos tratados con hidrogeles funcionalizados con heparinas resulta significativa, ya que en ellos se consiguió una remisión de los neutrófilos a tiempos más cortos y un cambio más temprano hacia una predominancia macrofágica. Es bien sabido que la presencia y actividad prolongadas de los neutrófilos en la herida provoca efectos deletéreos en la cicatrización, conduciéndola hacia un estado crónico (Dovi y cols., 2004; Martin y Leibovich, 2005; Eming y cols., 2007a; Menke y cols., 2007; Barrientos y cols., 2008; Wilgus, 2008; Ariel y Timor,)), por lo que un control temprano de estas células resulta altamente deseable.

Los resultados obtenidos en los estudios sobre macrófagos también mostraron los efectos beneficiosos de los de los hidrogeles HEP y BEM. Si bien es cierto que no lograron reducir el número total de macrófagos hasta los niveles del grupo sano, sí favorecieron el cambio hacia una predominancia del fenotipo M2 de los mismos, de manera opuesta a lo ocurrido en CTRL-D y PLCB. El aumento del ratio entre los fenotipos M2/M1 resulta de vital importancia, ya que indica un cambio en el tejido de granulación hacia un perfil de menor inflamación y propicio para la regeneración tisular (Varin y Gordon, 2009; Stout, 2010; Ferrante y Leibovich, 2012; Miao y cols., 2012).

En cuanto a la evolución de los mastocitos durante la cicatrización, el grupo control diabético mostró diferencias frente al control sano, observándose una menor cantidad de células cebadas tanto en los bordes como en el tejido de granulación neoformado. Estas deficiencias causadas por la diabetes desaparecieron en los grupos tratados con hidrogel, los cuales mostraron patrones similares a los de los animales sanos. Siendo un importante participante en la cicatrización cutánea (Noli y Miolo, 2001; Ng 2010; Oskeritzian 2012), la restauración de la respuesta mastocitaria sugiere una mejora en el proceso de reparación diabética.

Tomados en conjunto, estos resultados confirman la capacidad de los hidrogeles diseñados para el control de la inflamación exacerbada que tiene lugar en las heridas crónicas, y especialmente en las diabéticas (Wetzler y cols., 2000; Acosta y cols., 2008; Gurtner y cols., 2008; Menke y cols., 2008; Berlanga-Acosta y cols., 2010; Reinke y Sorg, 2012; Wicks y cols., 2014). Los mecanismos activados en las primeras fases para la defensa frente a patógenos y la limpieza de la herida actúan creando un ambiente tisular orientado hacia la degradación, principalmente mediante la liberación de proteasas, especies reactivas del oxígeno (ROS) y descenso del pH (Lauer y cols., 2000; Dovi y cols., 2004; Eming y cols., 2007a). Este ambiente es creado principalmente por la actividad de los **neutrófilos** y los **macrófagos** de fenotipo proinflamatorio, y su aparición ha sido seleccionada durante la evolución como una defensa frente a las posibles infecciones y septicemias causadas por la aparición de lesiones (Dovi y cols., 2004; Martin y Leibovich, 2005; Mantovani y cols., 2013). Sin embargo, se han realizado estudios que indican que esta respuesta no resulta vital para una correcta

cicatrización, llegando incluso a resultar beneficiosa la ausencia de la respuesta neutrofílica (Simpson y Ross, 1972; Dovi y cols., 2003; Martin y cols., 2003), lo cual ocurre, de hecho, en condiciones normales durante la cicatrización fetal (Eming y cols., 2007a; Wilgus, 2008; Reinke y Sorg, 2012; Wulff y cols., 2012). Mediante el control de los niveles de neutrófilos, el tratamiento con hidrogeles posiblemente influya en los niveles de proteasas y sus inhibidores (Eming y cols., 2007a; Menke y cols., 2007), permitiendo un ambiente favorable para la síntesis y acumulación de nueva matriz, así como para la supervivencia de mediadores proteicos clave, tales como los factores de crecimiento (Lauer y cols., 2000; Falanga, 2004; Eming y Krieg, 2006; Eming y cols., 2006; Berlanga-Acosta y cols., 2010; Eming y cols., 2010). Este efecto puede ser achacado, al menos en parte, al efecto protector contra la invasión bacteriana que ofrece el hidrogel, tanto por su efecto barrera como por la actividad antimicrobiana propia del quitosano (Boateng y cols., 2008; Dai y cols., 2011; Azuma y cols., 2015). No obstante, los restos de hidrogel mostraron una fuerte presencia tanto de neutrófilos como de macrófagos M1, actuando en su degradación. Sin embargo, esta presencia se encontró limitada a los bordes de absorción, sin mostrar incrementos en los niveles tisulares de los alrededores, por lo que parece que la actividad degradativa provocada por los geles se encuentra limitada a su más inmediata proximidad.

Siguiendo el avance en los tiempos de estudio, los grupos mostraron diferencias en el comportamiento de las **poblaciones macrofágicas**. El máximo de presencia de estas células observado en los controles sanos a 7 días se corresponde con lo esperado en la cicatrización normal (Daley y cols., 2010; Bannon y cols., 2013). Del mismo modo, el retraso que ocurrió en la progresión de los grupos diabéticos, cuyos niveles alcanzaron un máximo a día 14 y siguieron altos a día 21, es consecuente con la disfuncionalidad de los macrófagos en condiciones de diabetes que ha sido descrita por Mirza y Koh (2011). Los grupos HEP y BEM mostraron tan solo una discreta disminución en el número total de macrófagos, seguramente debido a la propia naturaleza proinflamatoria de la patología diabética, tales como la elevada presencia de AGEs y otros factores no modulables por la aplicación de los hidrogeles (Wetzler y cols., 2000; Brownlee, 2005; Goldin y cols., 2006; Eming y cols., 2007a; Goren y cols., 2007; Peppas y cols., 2009). El alto número de macrófagos en las heridas diabéticas se ha



relacionado con niveles elevados de mediadores proinflamatorios asociados con la respuesta inmune tipo Th1 (Wetzler y cols., 2000; Xu y cols., 2013; Wicks y cols., 2014). Sin embargo, el tratamiento con ambos tipos de hidrogel cargado consiguió inducir una mayor presencia del fenotipo de activación alternativa (M2) cuya presencia está relacionada con una respuesta tipo Th2 (Varin y Gordon, 2009), lo que posee importantes consecuencias en el proceso de cicatrización.

Aunque algunos estudios (Martin y cols., 2003) han descrito cicatrización en ausencia de macrófagos en modelos genéticamente deficientes, en condiciones normales las heridas con deficiencias macrofágicas demuestran una menor angiogénesis, epitelización alterada y fallo en la reparación (Mirza y cols., 2009; Lucas y cols., 2010; Xu y cols., 2013; Wicks y cols., 2014). Asimismo, la importancia y la existencia de múltiples funciones de los macrófagos a lo largo del proceso cicatrizal han sido puestas de manifiesto en un interesante artículo de Lucas y cols. (2010).

Estudios recientes (Mirza y Koh, 2011; Miao y cols., 2012; Okizaki y cols., 2015) han demostrado una polarización aberrante de los macrófagos asociada a la diabetes, tanto en modelos murinos db/db como en ratas diabéticas inducidas por STZ. En estos casos, los macrófagos de los animales diabéticos sufrieron fallos en la progresión normal hacia un fenotipo M2, manteniendo un estado proinflamatorio durante más tiempo. Esto mismo fue observado por Bannon y cols. (2013), quienes además demostraron una predisposición de los macrófagos en condiciones de diabetes hacia una polarización proinflamatoria, y constataron en úlceras de pacientes diabéticos que una incorrecta progresión hacia un fenotipo M2 resulta predictivo para lesiones no cicatrizantes. De manera adicional, se han descrito alteraciones de la eferocitosis por parte de los macrófagos en heridas diabéticas, asociándose a una persistencia inflamatoria (Khana y cols., 2010), y se han comprobado los efectos negativos de la diabetes sobre el desarrollo de vasos linfáticos durante la cicatrización, y la implicación de la activación macrofágica en este proceso (Maruyama y cols., 2007). Puesto que uno de los estímulos para la diferenciación macrofágica hacia un fenotipo M1 es la presencia de lipopolisacárido (Gordon, 2003; Mahdavian Delavary y cols., 2011; Xu y cols., 2013), la protección frente a la infección bacteriana ofrecida por los hidrogeles podría influir en la polarización hacia el fenotipo alternativo. Asimismo, se han descrito

efectos del quitosano favorecedores de una diferenciación macrofágica tipo M2 *in vitro* (Oliveira y cols., 2012). Sin embargo, los diferentes resultados obtenidos en los grupos HEP y BEM frente a PLCB apuntan hacia un efecto de la funcionalización de los geles con ambos tipos de heparina sobre la inducción de un fenotipo M2 en los macrófagos del tejido de granulación. Este efecto es respaldado por estudios en los que han sido descritas interacciones de la heparina con los receptores carroñeros o “scavenger” de los macrófagos (Peplow, 2005). Teniendo en cuenta todo esto, la restauración de una correcta polarización observada en los grupos tratados con hidrogeles HEP y BEM supone un gran avance en el tratamiento de este tipo de lesiones.

Las observaciones en las zonas dañadas de **músculo esquelético**, en las cuales la presencia de macrófagos M2 fue mayoritaria, coinciden con lo descrito por otros autores (Arnold y cols., 2007; Lucas y cols., 2010). Estos trabajos, así como nuestros resultados, parecen indicar que el daño muscular recluta macrófagos proinflamatorios, los cuales sufren un rápido cambio hacia el fenotipo M2, favoreciendo la miogénesis y la regeneración de la fibra, procesos que también han sido descritos en las muestras de este estudio.

En la **respuesta a cuerpo extraño** encontrada en los hidrogeles, la presencia de macrófagos no-M2 fue mayoritaria, como se ha comentado más arriba. Los bordes de los hidrogeles en proceso de absorción se encontraron poblados por macrófagos y células gigantes de cuerpo extraño negativas para CD206, inmersos en un proceso de degradación del material. En un estudio reciente, van Putten y cols. (2013) describieron bajos niveles de macrófagos positivos para CD206 en discos de colágeno implantados subcutáneamente, observando también un muy bajo número de células positivas para la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, marcador de fenotipo M1). Esto parece apoyar la idea de que la polarización de los macrófagos sigue un continuo con estados intermedios, siendo los fenotipos M1 y M2 extremos en este espectro (Mantovani y cols., 2004; Koh y DiPietro, 2011; Mantovani y cols., 2013; Xu y cols., 2013; Wicks y cols., 2014). Igualmente, ha de tenerse en cuenta que la descripción y caracterización de estos fenotipos proviene principalmente de estudios *in vitro* con condiciones altamente controladas (Gordon, 2003; Stout, 2010). Por ello,

ha de tenerse especial precaución al clasificar los distintos tipos de macrófagos en estas categorías cuando se llevan a cabo estudios *in vivo*, en los que las condiciones son mucho más complejas.

Las diferencias observadas en la presencia de **mastocitos** en los bordes de la herida y en la colonización del tejido de granulación entre los controles sano y diabético, así como el rescate producido por el tratamiento con hidrogeles resultan interesantes. Si bien es cierto que durante mucho tiempo el papel de los mastocitos en la cicatrización no resultaba claro, en los últimos años este tipo celular ha ido cobrando importancia, descubriéndose múltiples implicaciones en este proceso (Noli y Miolo, 2001; Ng 2010; Weller y cols., 2011; Wulff y Wilgus, 2013).

Los mastocitos son capaces de liberar una plétora de moléculas bioactivas en respuesta a estímulos de agresión, mecánicos y químicos. Son capaces de modular la inflamación, mediante mediadores tanto inductores (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-5, IL-6 e IL-8) como antiinflamatorios (IL-4, IL-10 e IL-13). También participan en las fases proliferativas y de remodelación, mediante la secreción de múltiples factores de crecimiento (PDGF, VEGF, FGF2, TGF- $\beta$ , NGF...), proteasas (quimasa, triptasa y gelatinasa), GAGs (perlecán, heparina...) y otros mediadores (histamina, eicosanoides, leucotrienos, etc.), favoreciendo la proliferación de fibroblastos, la migración de queratinocitos, el mantenimiento de la angiogénesis, la contracción y la colagenización de la herida (Noli y Miolo, 2001; Egozi y cols., 2003; Puxeddu y cols., 2003; Iba y cols., 2004; Moon y cols., 2010; Ng 2010; Weller y cols., 2011; Jung y cols., 2013; Wulff y Wilgus, 2013; Nishikori y cols., 2014).

Aunque algunos estudios relacionan la cicatrización anormal con un elevado número de mastocitos (Noli y Miolo, 2001; Oskeritzian, 2012), en el presente trabajo no se observaron tales aumentos. Esto es posiblemente debido a la distinta naturaleza de la herida, ya que el modelo utilizado no se corresponde con los procesos de cicatrización hipertrófica y los queloides, donde se han descrito principalmente estos niveles elevados (Ehrlich, 2013; Wulff y Wilgus, 2013), llegando a constatarse los efectos profibróticos de los mastocitos en modelos de cicatrización fetal y de inhibición mastocitaria (Wulff y cols., 2012; Chen y cols., 2014). En un modelo similar al

empleado, [Nishikori y cols. \(2014\)](#) observaron un menor número de células cebadas en la cicatrización de ratones diabéticos inducidos por STZ, de manera consecuente con nuestros resultados.

Por otro lado, se ha postulado que la carencia de células cebadas provoca una cicatrización deficiente ([Weller y cols., 2006](#)), aunque estudios más recientes llevados a cabo por [Antsiferova y cols. \(2013\)](#) argumentan que la presencia de mastocitos no es necesaria para una correcta reparación cutánea. Como discuten los autores de este trabajo, los distintos modelos animales de depleción de mastocitos empleados seguramente sean la causa de las diferencias con las observaciones previamente descritas. Sin embargo, aunque es probable que estas células no sean indispensables, parece que su participación en el proceso de cicatrización no es nula. Teniendo en cuenta esto, resulta complicado establecer si las diferencias observadas en el presente estudio en cuanto a la distribución mastocitaria constituyen una causa o una consecuencia de la diferente progresión y calidad de la reparación en los distintos grupos.

La restauración de los niveles de mastocitos en los bordes de la herida propiciada por los tratamientos con hidrogeles podría participar en la mejor proliferación y migración de las células epiteliales observada en estos grupos frente al control diabético. Este planteamiento se basa en la acción favorecedora de los mastocitos en estos procesos, debido a los factores de crecimiento secretados y a la acción de sus proteasas degradando la membrana basal ([Noli y Miolo, 2001](#); [Ng 2010](#)). Otro planteamiento interesante es la interacción de estas células con los macrófagos y su posible papel en la modulación de la actividad de los mismos. Aunque las células cebadas liberan mediadores proinflamatorios en las primeras etapas, favoreciendo la inflamación, pueden también secretar factores antiinflamatorios, como la IL-4 y la IL-10, y se sabe que son capaces de aumentar la capacidad fagocítica de los macrófagos ([Noli y Miolo, 2001](#); [Varin y Gordon, 2009](#)). Cabe la posibilidad de que los mastocitos sean capaces de inducir la aparición del fenotipo M2 en los macrófagos gracias a la actividad a nivel paracrina de estos mediadores, favoreciendo la transición hacia un estado reparativo de la herida. Esta teoría ayudaría a explicar las diferencias en la proporción de las poblaciones macrofágicas observadas en el presente trabajo, y estaría apoyada por la

frecuente aparición de los mastocitos junto con macrófagos cargados con hemosiderina, así como en las zonas donde se observó un predominio del fenotipo alternativo. Sin embargo, para poder dilucidar este papel en la cicatrización, se necesitan más estudios.

Por último, los fenotipos de los mastocitos, así como sus productos de secreción, son diferentes según su lugar de procedencia y especie (Puxeddu y cols., 2003; Moon y cols., 2010; Ng, 2010). Ya que la mayoría de los estudios sobre estas células han sido llevados a cabo en rata y ratón, las predicciones sobre su función en humanos han de realizarse con gran cautela.

La cuantificación de la **expresión de mediadores inflamatorios** en el tejido cicatrizal mediante qPCR mostró pocas diferencias significativas entre los grupos de estudio a lo largo del tiempo. Aunque pudo observarse un patrón común en las expresiones de IL-6 e IFN-  $\gamma$ , la IL-10 y especialmente el TNF-  $\alpha$  siguieron tendencias menos definidas.

Durante la reparación diabética, se han descrito niveles altos de TNF- $\alpha$  en el ambiente de la herida asociados a una inflamación elevada (Goren y cols., 2007; Siqueira y cols., 2010; Xu y cols., 2013), los cuales se mantienen hasta al menos la segunda semana tras la lesión (Wetzler y cols., 2000; Werner y cols., 2007), o incluso más tarde (Martins-Green y cols., 2013). En el presente estudio, esta citoquina mostró menor expresión en el grupo CTRL-S durante los primeros tiempos de estudio, aunque estas diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas, debido principalmente a la existencia de una notable variabilidad biológica intragrupal.

Por el contrario, la expresión de la IL-10 mostró diferencias más claras entre los grupos sanos y diabéticos, llegando a ser significativa a 14 días. Al poseer esta interleuquina propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras (Werner y Grose, 2003), este menor resultado en animales sanos parece entrar en conflicto con la menor inflamación observada en este grupo a lo largo del estudio. Esta aparente contradicción es probablemente una consecuencia del propio efecto de esta citoquina al reducir la inflamación. CTRL-S mostró una menor cantidad de macrófagos en su tejido, siendo estos leucocitos unos de los principales productores de esta interleuquina (Eming y cols., 2007b; Kenneth Ward, 2008). Asimismo, los niveles



elevados de IL-10 en los grupos diabéticos concuerdan con lo observado en heridas crónicas (Werner y Grose, 2003), lo cual podría indicar la existencia de un mecanismo de sobrecompensación en este tipo de lesiones, con la finalidad de lograr una remisión de la inflamación.

La IL-6 mostró una fuerte inducción en los estadios iniciales, que fue más marcada en los grupos tratados con hidrogel. La alta presencia de neutrófilos y macrófagos M1, principales encargados de la síntesis de esta citoquina (Werner y Grose, 2003; Hinz, 2007; Barrientos y cols., 2008; Kenneth Ward, 2008), que aparecieron asociados a las zonas de gel en degradación son seguramente la causa de este mayor nivel, ya que la presencia de reacción a cuerpo extraño puede potenciar la inflamación (Broughton y cols., 2006). A partir del tercer tiempo de estudio los niveles de la IL-6 se redujeron notablemente, siguiendo una progresión descrita previamente (Gallucci y cols., 2000), sin mostrar diferencias entre los grupos.

Los niveles de IFN- $\gamma$  no mostraron diferencias significativas entre los grupos, observándose una tendencia generalizada hacia una mayor expresión en los tiempos más avanzados. Se han descrito efectos inhibidores de la cicatrización para esta citoquina (Miles y cols., 1994; Laato y cols., 2001; Ishida y cols., 2004), lo que explicaría su baja expresión en los estadios iniciales. Asimismo, el IFN- $\gamma$  es capaz de inhibir la proliferación de fibroblastos (Broughton y cols., 2006), así como la angiogénesis y síntesis de colágeno, y es capaz de regular negativamente la acción del TGF- $\beta$  (Ishida y cols., 2004), consecuentemente con los patrones de expresión opuestos de estos dos genes observados en el presente trabajo. Todo ello parece indicar un posible papel de este interferón en la fase de remodelación, ayudando a revertir los procesos proliferativos y fibrogénicos activados en estadios anteriores. Esta conjetura es apoyada por otros estudios en los que se ha detectado presencia de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en las fases tardías del proceso cicatrizal, capaces de estimular quimioquinas angiostáticas y favoreciendo la resolución de la inflamación tardía linfocitaria por apoptosis (Martins-Green y cols., 2013).

Aunque en la bibliografía es frecuente la asociación de la patología diabética con un nivel más elevado de expresión de citoquinas proinflamatorias (Wetzler y cols., 2000;

Barrientos y cols., 2008; Xu y cols., 2013), existen estudios con resultados contradictorios, parcial o totalmente (Kämpfer y cols., 2000; Miao y cols., 2012). Esta disparidad de resultados puede ser achacable a múltiples factores, como diferencias en los modelos animales (especie, tipo de diabetes experimental, edad y/o progresión de la patología), en los defectos (tipo de defecto, tamaño, manejo de la herida, cobertura, etc.), en la recogida de muestras (profundidad de la biopsia, presencia o ausencia de bordes del defecto y proporción de dicho tejido) o en la propia técnica experimental de qPCR (comprobación y corrección de eficiencia, elección de un gen de normalización, etc.). Todo ello pone de manifiesto la necesidad de una estandarización de los protocolos y procedimientos de experimentación para poder obtener resultados robustos y reproducibles, y conseguir avanzar en el conocimiento de las funciones de estos mediadores en la patología diabética.

Por último, la cuantificación de los niveles en suero de estos mediadores inflamatorios mediante ELISA arrojó resultados por debajo de los límites de detección de manera consistente. Estos niveles se corresponden, según el proveedor de los enzimoanálisis, con la presencia encontrada en sangre para animales sanos en condiciones normales, lo que indicaría que los procesos cicatrizales no están provocando respuestas inflamatorias sistémicas, pudiendo estar limitada su acción al entorno del defecto. Esta ausencia de elevación de citoquinas en sangre ha sido observada por otros autores (Kämpfer y cols., 2000; Goren y cols., 2007), demostrando que durante el proceso cicatrizal estos mediadores actúan a cortas distancias y/o en tiempos reducidos (Kenneth Ward, 2008), por lo que sería interesante para posteriores estudios realizar cuantificaciones sobre lisados tisulares (Egozi y cols., 2003; Siqueira y cols., 2010; Mirza y Koh, 2011).

## 5.5 PROLIFERACIÓN Y REMODELACIÓN TISULAR

En el desarrollo de los procesos de cicatrización, la consecución de un cierre lo más temprano posible es el principal objetivo de los mecanismos implicados (Bayat y cols., 2003; Gurtner y cols., 2008). Para ello, el organismo ha de ser capaz de reducir la brecha cutánea en la medida de lo posible y generar un nuevo tejido de granulación

sobre el que pueda formarse una barrera epitelial, alcanzando una solución de continuidad y evitando reaperturas de la lesión mediante la formación de una matriz resistente. Esto se logra gracias a los procesos de proliferación celular, síntesis de nueva matriz extracelular y maduración de la misma (Singer y Clark, 1999; Williamson y Harding, 2004; Gurtner y cols., 2008). Puesto que las alteraciones de estos fenómenos debidos a la diabetes mellitus y la hiperglucemia asociada han sido ampliamente descritas (Brownlee, 2005; Goldin y cols., 2006; Acosta y cols., 2008; Peppas y cols., 2009), la valoración de estos procesos resulta de vital importancia para la evaluación de los efectos de los tratamientos aplicados. En nuestro caso, los cinco grupos de estudio lograron alcanzar porcentajes de cierre similares. Sin embargo, el análisis microscópico detallado de las muestras reveló importantes diferencias en la calidad del proceso cicatrizal entre ellos.

Como se ha expuesto anteriormente, los animales diabéticos mostraron una inflamación más intensa y prolongada en el tiempo, logrando una mejor resolución los grupos que recibieron tratamiento con hidrogeles cargados con heparina sin fraccionar o bemiparina. Puesto que la atenuación de la inflamación es necesaria para la progresión de la cicatrización (Menke y cols., 2007; Reinke y Sorg, 2012), estos grupos fueron capaces de acelerar el avance del proceso reparativo con respecto a CTRL-D y PLCB, mostrando de manera más temprana características de las fases proliferativa y de remodelación tisular.

Ha sido descrito por numerosos autores (Falanga, 2004; Sen y Roy, 2008; Gallant-Behm y Mustoe, 2010; Junker y cols., 2013) que el mantenimiento de un ambiente húmedo propicia un mejor proceso de cicatrización, especialmente en aquellas heridas cuya progresión está comprometida. Los dispositivos que favorecen este tipo de ambiente son además compatibles y adecuados para vehiculizar sustancias bioactivas de una manera precisa y controlada (Junker y cols., 2013). Efectivamente, en nuestro caso pudo constatarse cómo los animales a los que les fueron aplicados los hidrogeles de quitosano mostraron una superficie tisular menos dañada. El elevado contenido en agua de los geles, unido al propio efecto cobertor de los mismos en los momentos iniciales, parece resultar beneficioso para los estadios tempranos de la cicatrización, en

los que la desecación del tejido expuesto puede agravar la curación de la herida y producir daño tisular adicional (Stadelmann y cols., 1998).

Pese a que el proceso de **reepitelización** tuvo una aportación limitada sobre el cierre de la herida, debido a la propia fisiología del animal de experimentación utilizado (Galiano y cols., 2004a; Bao y cols., 2008), pudieron observarse diferencias en la calidad de este proceso entre los distintos grupos. Desde el primer tiempo de estudio (3 días), el grupo control diabético mostró un menor grosor de las lenguas epiteliales, así como una peor organización, estando este tipo de alteraciones en la migración y diferenciación de los queratinocitos asociado a la patología diabética (Brem y Tomic-Canic, 2007). La mejora observada del proceso epitelial en los grupos HEP y BEM puede deberse a varios factores. Por un lado, la generación de un tejido de granulación adecuado permite un correcto avance del nuevo epitelio, ya que supone un soporte necesario para la migración de los queratinocitos. Además, los mayores grosores epiteliales en estos grupos son debidos a una mayor capacidad proliferativa, similar a la observada en el grupo sano. Este aumento en la proliferación de los queratinocitos causado por la administración de geles con heparina puede explicarse por la capacidad estabilizadora y potenciadora de factores de crecimiento que posee este GAG (Fujita, 2000; Peplow, 2005; Fujita y cols., 2007; Norrby y Nordenhem, 2010; Liang y Kiick, 2014; Sakiyama-Elbert, 2014), como el FGF2 o el FGF7 (KGF), conocidos mitógenos de este tipo celular. Puesto que la epidermis es una importante fuente de factores de crecimiento durante la cicatrización (Werner y Grose, 2003; Eming y cols., 2007a; Barrientos y cols., 2008), y es capaz de interactuar y modular las funciones de otras células como fibroblastos, miofibroblastos y mastocitos (Noli y Miolo, 2001; Werner y cols., 2007), una mejor respuesta epitelial supone una mejora global del proceso, más allá del mero hecho de cubrir el tejido expuesto.

Un hecho interesante observado durante la epitelización fue la detección de  $\alpha$ SMA en los estratos suprabasales de los bordes en migración y proliferación. Este marcaje fue observado de manera más intensa a día 3, y fue siendo cada vez más débil a medida que avanzaba el tiempo de estudio, lo que parece indicar que esta proteína citoesquelética posee algún tipo de función durante la epitelización. Los queratinocitos poseen gran plasticidad; cuando son activados tras la lesión sufren una

desdiferenciación (Sivamani y cols., 2007), siendo capaces incluso de sufrir transiciones epitelio-mesenquimales, proceso en el que influye la actividad de las MMPs (Radisky y cols., 2007; Wynn, 2008). Se ha constatado que, tras su activación, estas células sufren cambios en su citoesqueleto (Morasso y Tomic-Canic, 2005), por lo que la expresión de esta proteína asociada a procesos de movilidad y contracción podría estar relacionada con los procesos de migración epitelial. Esto explicaría la desaparición del marcaje en las zonas con epitelización avanzada, en las que los queratinocitos retornan a su estado diferenciado y vuelven a conformar un epitelio estratificado.

Uno de los efectos más importantes causados por los hidrogeles con heparinas fue la mejor **granulación** lograda por estos animales. En estudios *in vitro* se ha comprobado la capacidad de las heparinas para revertir la proliferación reducida que presentan los fibroblastos de úlceras de pacientes diabéticos (Hehenberger y cols., 1998), lo que ayuda a explicar la mejor respuesta en la granulación de los grupos HEP y BEM frente a CTRL-D. Además de las células del sistema inmune, los fibroblastos también pueden influir en el control de la inflamación crónica (Buckley y cols., 2001), por lo que la actividad de las heparinas sobre estas células podría contribuir a la mejor resolución inflamatoria observada en HEP y BEM.

Se ha descrito que en estudios experimentales de cicatrización en modelos animales diabéticos tiene lugar una granulación deficiente, con una síntesis de colágeno reducida y defectos en su maduración (Broughton y cols., 2006). Esto mismo fue observado en el presente trabajo, ya que desde el segundo tiempo de estudio (7 días) el grupo control diabético mostró un retraso notable en la formación de una nueva matriz, lo que se mantuvo hasta el último tiempo de estudio, en el que mostró un grosor de la neodermis significativamente menor que el control sano y que los grupos tratados con hidrogeles cargados con heparinas. Por su parte, el grupo PLCB mostró una ligera mejora, aunque su patrón global fue similar al que siguió CTRL-D. De manera similar, un estudio realizado por Kus y Bienkiewicz (2006) mostró un aumento en la síntesis de colágeno provocado por el tratamiento subcutáneo con heparinas, lo que concuerda con la mejor colagenización observada en los grupos HEP y BEM. Esto sugiere que la mejora en el proceso de granulación presentada por estos grupos no se



debe tan solo a la menor inflamación, sino también a un efecto favorecedor de la síntesis de nueva matriz por parte de las heparinas.

Durante la cicatrización, la **matriz extracelular** no es simplemente un componente estructural sintetizado para lograr el cierre, sino que actúa como un elemento dinámico e influyente en el proceso. En este aspecto tienen especial relevancia los estímulos mecánicos, así como las interacciones de la matriz con las distintas poblaciones celulares y con los factores de crecimiento (Eckes y cols., 2010; Eming y Hubbell, 2011; Schultz y cols., 2011; Volk y cols., 2013). Debido a ello, las modificaciones de la matriz causadas por la diabetes afectan a los procesos de síntesis y remodelación de la misma. La glicación del colágeno causa una disminución en la unión y proliferación de los fibroblastos, mayor rigidez y un aumento del estrés oxidativo y la apoptosis asociada (Liao y cols., 2009; Loughlin y Artlett, 2009; Peppas y cols., 2009; Loughlin y Artlett, 2010), lo que ayuda a explicar en parte la menor respuesta de CTRL-D en cuanto a la formación de un nuevo tejido. Sin embargo, resulta poco probable que los hidrogeles funcionalizados sean capaces de actuar sobre el estado de glicación de la matriz, por lo que su acción procicatrizante debe actuar en otro ámbito.

Uno de los posibles mecanismos a través del cual los hidrogeles cargados con heparinas consiguieron mejorar la formación de nuevo tejido se cimienta sobre la capacidad de interacción entre estos polisacáridos y los factores de crecimiento. En las heridas diabéticas, la vida media de los factores de crecimiento se ve reducida debido al ambiente proteolítico que presentan (Lobmann y cols., 2002; Eming y Krieg, 2006; Gill y Parks, 2008; Eming y cols., 2010), y su actividad biológica se ve comprometida por la glicación inespecífica que pueden sufrir (Goldin y cols., 2006; Peppas y cols., 2009). Sin embargo, la unión de estos factores a la heparina les dota de una mayor resistencia a estas reacciones (Nissen y cols., 1999; Peplow, 2005; Norrby y Nordenhem, 2010), permitiendo una mayor actividad de los mismos. Esto ayudaría a explicar la mejor granulación de los grupos HEP y BEM, en los que se entraría en un estado de síntesis neta de matriz.

El análisis de la expresión génica de FGF2, VEGF-A y TGF- $\beta$ 1 parece apoyar esta teoría. La cuantificación mediante qPCR del mRNA de estos genes no mostró diferencias significativas entre los grupos en ningún tiempo de estudio, por lo que los diferentes resultados en la cicatrización observados no se deben a un efecto de los hidrogeles sobre la expresión de factores de crecimiento. Por tanto, parece probable que el mecanismo de actuación de los apósitos empleados implique una estabilización de estas moléculas mediada por la heparina y la bemiparina cargada en los hidrogeles de quitosano. Aunque [Carrol y Koch \(2003\)](#) han descrito que la adición de heparina a cultivos celulares de fibroblastos provoca un aumento en la síntesis de factores de crecimiento, la procedencia de cada tipo de cultivo celular a partir de un único donante hace que resulte difícil su extrapolación. Además, debido al diseño del experimento no puede descartarse que la mayor cantidad observada mediante ELISA por estos autores sea causada por acumulación debido al aumento de la vida media de los factores de crecimiento causado por la heparina ([Norrby y Nordenhem, 2010](#); [Liang y Kiick, 2014](#); [Sakiyama-Elbert, 2014](#)).

Los perfiles de expresión observados para el VEGF-A y el FGF2 mostraron niveles estables del primero a lo largo del estudio, mientras que el segundo aumentó su expresión tras la primera semana. Estas observaciones concuerdan con la literatura ([Bao y cols., 2009](#)), donde se describe una elevación posterior del FGF2 con respecto al VEGF-A, que se explica como un mecanismo de coordinación temprana y tardía de la angiogénesis.

Por su parte, la expresión del TGF- $\beta$ 1 mostró un pico de expresión 7 días después de la lesión, para posteriormente ir reduciendo su nivel. La inducción de este factor de crecimiento a los 7 días ha sido también descrito por otros autores ([Frank y cols., 1996](#); [Pakyari y cols., 2013](#)), y coincide en el tiempo con la aparición en el tejido de granulación de los miofibroblastos ([Werner y cols., 2007](#)). El TGF- $\beta$ 1 es un potente inductor de la diferenciación hacia este tipo celular ([Desmoulière y cols., 2005](#); [Boo y Dagnino 2013](#); [Finnson y cols., 2013](#)) y, por su parte, los miofibroblastos son los principales secretores de matriz extracelular durante la reparación cutánea ([Hinz 2007](#); [Klingberg y cols., 2013](#)). Esto explicaría los patrones de expresión similares que se observaron para el TGF- $\beta$ 1 y los colágenos tipo I y III, tanto en su perfil a lo largo del

estudio como en su patrón por grupos en cada tiempo. A su vez, la expresión de estas proteínas matriciales coincide con lo observado por [Rodero y cols. \(2013\)](#), quienes describen una máxima expresión de colágeno I siete días después de la lesión en un modelo murino.

Como se ha comentado anteriormente, la **contracción** del defecto fue el suceso que más contribuyó al cierre en todos los grupos de estudio. Los fenómenos de contracción tisular que ocurren durante la reparación cutánea son achacados principalmente a la aparición de los miofibroblastos y su capacidad contráctil ([Desmoulière y cols., 2005](#); [Hinz, 2010](#); [Finnson y cols., 2013](#)), aunque la organización y engrosamiento de las fibras de colágeno, así como las fuerzas de tracción ejercidas sobre ellas por los fibroblastos parecen participar de una manera importante ([Ehrlich y Hunt, 2012](#)).

En los cinco grupos de estudio, los **miofibroblastos** hicieron su aparición una semana después de la realización del defecto. En condiciones normales, como se observó en el grupo CTRL-S, tras su participación en la contracción y en la síntesis de nueva matriz, este tipo celular desaparece por apoptosis durante la maduración de la herida ([Greengalgh, 1998](#)). Los grupos tratados con hidrogel mostraron una presencia discreta de estas células a 21 días con tendencia a aparecer en la superficie del tejido, siendo esta la zona de mayor aproximación entre los bordes. Esta presencia, aunque fue mayor que en el grupo sano, mostró una clara tendencia hacia su reducción a lo largo del tiempo. Por el contrario, el grupo CTRL-D mantuvo niveles relativamente elevados en el último tiempo de estudio, indicando un retraso en la cicatrización con respecto al resto de los grupos. Ya que los miofibroblastos son considerados los principales productores de matriz extracelular durante la reparación ([Hinz, 2007](#); [Klingberg y cols., 2013](#)), contrasta el hecho de que este grupo presente un tejido de granulación de reducido espesor y pobre en colágeno. La explicación más plausible parece ser la existencia de inflamación persistente en este grupo y la alta actividad proteasa asociada a ella ([Nwomeh y cols., 1999](#); [Parks, 1999](#); [Vaalamo y cols., 1999](#); [Lobmann y cols., 2002](#); [Gill y Parks, 2008](#)). Este ambiente propenso a la degradación proteica causaría una menor producción neta de componentes matriciales, explicando el menor grosor observado en estas muestras y el retraso en la acumulación y maduración de la matriz.

De manera general, la distribución y organización de los miofibroblastos mostró patrones que resultan interesantes. Su presencia, en un principio abundante en todo el tejido de granulación fue gradualmente limitándose a la zona superficial. Asimismo, se observó su presencia en los bordes de la herida, en muchas ocasiones cortados transversalmente en las preparaciones histológicas. Esta distribución sugiere la colaboración de dos fuerzas ejercidas por este tipo celular actuando coordinadamente para contraer el tejido y aproximar los bordes. Por un lado, los miofibroblastos de los bordes ejercerían una contracción de los bordes formando un anillo contráctil. Adicionalmente, en la zona central se producirían tracciones centrípetas sobre los bordes, actuando más superficialmente a medida que avanza el proceso, lo que causaría el perfil inclinado de los bordes y la morfología troncocónica del tejido de granulación característicos de la cicatrización en este modelo. Esto, no obstante, es tan solo una hipótesis, y se requieren estudios histológicos adicionales para su confirmación.

En cuanto a la diferente organización de los miofibroblastos entre los grupos de estudio, se pudo observar una menor organización de los mismos en los grupos CTRL-D y PLCB. A diferencia de CTRL-S, HEP y BEM, que mostraron una propensión al alineamiento de estas células a lo largo de la preparación, estos dos grupos presentaron patrones menos uniformes, con una mayor frecuencia de miofibroblastos seccionados transversalmente. Puesto que las preparaciones histológicas están realizadas siguiendo el eje antero-posterior, la diferente organización de los miofibroblastos en CTRL-D y PLCB parece estar relacionada con el cierre ojival observado macroscópicamente en estos grupos.

Además de su empleo en el estudio de los miofibroblastos, el marcaje de la  $\alpha$ SMA nos permitió cuantificar la **vascularización** en el tejido de granulación neoformado. En todos los grupos, a día 7, pudo observarse la aparición de nuevos vasos sanguíneos irradiando desde el músculo subyacente y los bordes hacia la superficie para lograr el restablecimiento del aporte de oxígeno (Stadelmann y cols., 1998). La presencia de vasos aumentó a los 14 días tras la lesión en todos los grupos, sin mostrar diferencias significativas entre los grupos en ninguno de estos dos tiempos de estudio. En cambio, las observaciones a día 21 mostraron notables diferencias en la evolución de la red

vascular. CTRL-S mostró una importante regresión en su vasculatura, siguiendo la progresión característica de un tejido en estado de remodelación y maduración (Greengalgh, 1998; Singer y Clark, 1999; Reinke y Sorg, 2012). Por el contrario, CTRL-D y PLCB continuaron mostrando una fuerte presencia vascular, lo que resultó indicativo de su falta de progresión en el proceso cicatrizal (Falanga, 2004; Menke y cols., 2007). En cambio, los resultados observados en los grupos HEP y BEM indicaron un efecto favorable de los hidrogeles funcionalizados con heparinas, ya que en estos grupos la vasculatura mostró signos de retracción. Aunque no se consiguió alcanzar la respuesta observada en los controles sanos, la aplicación de los hidrogeles con heparina no fraccionada o bemiparina logró acelerar el proceso cicatrizal diabético y romper el estancamiento del proceso observado en CTRL-D y PLCB.

## 5.6 VALORACIÓN GLOBAL DE LA CICATRIZACIÓN

La mejor respuesta en la remisión de la inflamación observada en los grupos tratados con hidrogeles funcionalizados con heparinas puede explicarse en parte por las actividades que estas moléculas tienen sobre el proceso inflamatorio. Se ha descrito que estos glicosaminoglicanos son capaces de modular la respuesta inflamatoria de los leucocitos, inhibiendo la síntesis de ROS y de citoquinas proinflamatorias y reduciendo el reclutamiento de células blancas (Dandona y cols., 1999; Salas y cols., 2000; Peplow, 2005; Hochart y cols., 2008; Mousa, 2010; Lakshmi y cols., 2011), por lo que en la mejora de la inflamación asociada a la diabetes observada en estos grupos la intervención de ambos tipos de heparina parece clara. Adicionalmente, el quitosano también es capaz de modular la respuesta inflamatoria y actuar contra invasiones microbianas (Dai y cols., 2011), lo que también supone un efecto beneficioso en este tipo de heridas.

La aceleración en la remisión de la inflamación en los grupos diabéticos tratados con hidrogeles funcionalizados permitió a su vez que las heridas mostraran un mejor proceso de formación de nuevo tejido, así como una inducción más temprana del mismo. No obstante, se ha descrito que los procesos proliferativos, sintéticos y de remodelación que ocurren durante la cicatrización, especialmente en condiciones



comprometidas, también son potenciados por los tratamientos con heparina y/o quitosano (Kratz y cols., 1998; Ueno y cols., 2001; Kalani y cols., 2003; Rullan y cols., 2008; Dai y cols., 2011; Lakshmi y cols., 2011; Azuma y cols., 2015), aportando ventajas adicionales al tratamiento con los apósitos diseñados en cuanto a la velocidad y calidad de la reparación.

La discreta mejora en la cicatrización del grupo PLCB con respecto a CTRL-D pone de manifiesto que, pese a que el quitosano posee propiedades procicatrizantes (Ueno y cols., 2001; Dai y cols., 2011; Azuma y cols., 2015), su acción aislada no es capaz de contrarrestar significativamente los impedimentos que la diabetes experimental ejerce sobre la reparación. Sin embargo, su acción sumada a la de la heparina sin fraccionar o la bemiparina provoca una mejora notable de la cicatrización, lo que pone de manifiesto la capacidad de estas sustancias para actuar coordinadamente y potenciar la reparación de heridas diabéticas.

Con respecto a las complicaciones asociadas al uso de heparinas, como la pérdida ósea o la trombocitopenia inducida por heparina (Hirsh y Raschke, 2004; Nowak, 2009; Sarahrudi y cols., 2012), la aparición de este tipo de incidencias no resulta probable debido a la baja cantidad administrada tópicamente (<2 mg/gel) y a su lenta liberación, especialmente en la potencial traslación al humano, donde el índice superficie/masa es muy inferior. No obstante, el uso de LMWH frente a UFH supone una ventaja en este aspecto (Hirsh y Raschke, 2004; Merli y Groce, 2010; Mousa, 2010) por lo que, en principio, los hidrogeles cargados con heparina podrían considerarse más seguros para su empleo.

Teniendo en cuenta de manera global los resultados en los parámetros y procesos estudiados de los cinco grupos a lo largo del tiempo, pudieron establecerse importantes **diferencias en los procesos cicatrizales** de los mismos.

El grupo CTRL-S siguió un patrón de cicatrización normal, mostrando características propias de las tres fases del proceso reparativo de manera progresiva y ordenada, alcanzando finalmente un tejido nuevo con celularidad reducida por los procesos de maduración, y una matriz densa y bien organizada. Por el contrario, el grupo CTRL-D mostró un importante retraso en el proceso, con una inflamación sostenida en el

tiempo e importantes carencias en la formación del tejido de granulación, tanto en cantidad como en calidad. La falta de resolución de la inflamación, así como la permanencia de una fuerte vascularización y presencia miofibroblástica indicaron un estancamiento del proceso cicatrizal debido a la patología diabética.

Aunque el grupo tratado con hidrogel PLCB consiguió mejorar algunos aspectos de la cicatrización, como el control de la inflamación y reducción del daño tisular, los mejores resultados de los grupos diabéticos se observaron en los grupos HEP y BEM. La aplicación de hidrogeles funcionalizados con ambos tipos de heparina logró mejorar los procesos inflamatorios, la epitelización y la formación de un nuevo tejido de granulación. Aunque estos grupos no alcanzaron los resultados que presentaron los controles sanos, sí que consiguieron mejorar de manera significativa el proceso cicatrizal observado en CTRL-D, tanto en la calidad de la cicatrización como en la aceleración de la misma.

Si bien las heridas de tamaño considerable, como los defectos realizados en este trabajo, pueden presentar diferentes estados y fases de la cicatrización a lo largo de su extensión ([Greengalgh, 1998](#); [Falanga, 2005](#)), la valoración global de las heridas y su evolución hasta el final del estudio dieron como resultado la predominancia de diferentes fases en cada grupo a día 21. CTRL-S mostró claras características de una fase de remodelación, mientras que CTRL-D permaneció estancada en un estado inflamatorio/proliferativo. PLCB mostró un perfil ligeramente más avanzado que CTRL-D, aunque sin lograr tampoco la adecuada resolución de la inflamación. Por su parte, HEP y BEM mostraron una fase más avanzada del proceso reparativo, alcanzando un estado de remisión proliferativa y comienzo de maduración.

Por tanto, los resultados obtenidos en el análisis integral del proceso de cicatrización en rata diabética tras la aplicación de hidrogeles de quitosano cargados con UFH o bemiparina indican la existencia de un efecto beneficioso de los mismos sobre el proceso reparativo en el modelo diabético experimental empleado.

## 5.7 TERAPIAS EMPLEADAS PARA LA MEJORA DE LA CICATRIZACIÓN COMPROMETIDA

Debido a la importancia sanitaria que suponen las heridas crónicas, y en especial las úlceras asociadas a diabetes, la investigación para la búsqueda de nuevos dispositivos y estrategias terapéuticas es muy extensa. Existe una ingente cantidad de estudios a distintos campos y niveles, incluyendo ciencia de materiales, experimentos *in vitro*, estudios *in vivo* y pruebas clínicas, cuyo objetivo es conseguir mejorar los procesos de cicatrización.

Durante las últimas décadas, el desarrollo de la **Ingeniería Tisular** ha permitido el diseño y creación de nuevas terapias para el tratamiento de lesiones cutáneas recalcitrantes (Clark y cols., 2007; Kamel y cols., 2013). Sin embargo, aunque se han obtenido éxitos en el campo, aún no ha producido progresos significativos en el ámbito clínico. Algunos de los principales problemas, en adición a los puramente científicos, son la difícil automatización de los procesos, la insuficiente regulación en el campo y el desconocimiento y escepticismo frente a las nuevas terapias (Metcalfe y Ferguson, 2007a).

Se han empleado distintos tipos de **terapia celular** para el tratamiento de heridas crónicas, incluyendo modelos de cicatrización isquémica y diabética. Dentro de estas aproximaciones, se han empleado células de distinta naturaleza, tanto tipos celulares diferenciados (principalmente fibroblastos y queratinocitos) como células madre de diferentes orígenes (médula ósea, tejido muscular, adiposo, etc.), con resultados generalmente positivos tal y como se describe en la literatura (Buján y cols., 2006, Cavallini, 2007; Cha y Falanga 2007; Volk y cols, 2007; Wu y cols., 2007b; Gurtner y cols., 2008; Chen y cols., 2009a; Velander y cols., 2009; Amos y cols., 2010; Han y cols., 2010; Hocking, 2012).

Desafortunadamente, este tipo de terapias presenta inconvenientes a la hora de ser aplicados. Uno de los principales a considerar es la fuente celular, siendo la mejor opción la procedencia autóloga. Sin embargo, el tiempo necesario para establecer y propagar un cultivo de este tipo puede resultar demasiado largo para muchas aplicaciones en las que se requiere un tratamiento rápido (Metcalfe y Ferguson,

2007b). Un problema adicional de la terapia celular autóloga para el tratamiento de lesiones diabéticas es la disfunción de los tipos celulares causada por la patología. Aunque hay algunos parámetros en los que no se han encontrado diferencias entre células sanas y diabéticas en cultivo, como en la expresión de mediadores proinflamatorios en queratinocitos (Brandner y cols., 2008), existen múltiples estudios describiendo diferencias persistentes, como la reducción en la migración, proliferación y respuesta a hipoxia, en células procedentes de sujetos diabéticos (Hehenberger y cols. 1998; Loots y cols., 1999; Okano y cols., 2002; Lerman y cols., 2003; Menke y cols., 2007). Estos factores suponen una importante limitación de la terapia celular autóloga en cuanto a su utilidad y potencial terapéutico en pacientes diabéticos.

Dentro de este campo, el empleo de **sustitutos cutáneos** para el tratamiento de úlceras de difícil curación supone una prometedora terapia. Sin embargo, el uso de este tipo de constructos presenta ciertos problemas como una reducida vascularización, ausencia de estructuras diferenciadas, persistencia celular en injertos heterólogos, propiedades mecánicas no adecuadas, problemas de biocompatibilidad y difícil manejo por parte del personal sanitario, a lo que ha de añadirse en muchos casos los inconvenientes de la terapia celular anteriormente expuestos. Aunque en un futuro el uso de este tipo de dispositivos supondrá una gran mejora en el tratamiento de heridas comprometidas, aún es necesario continuar investigando para demostrar de forma robusta su efectividad, así como lograr una reducción de coste que haga viable su uso. Para su investigación y posible uso deberían seleccionarse poblaciones adecuadas de pacientes, excluyendo aquellos con mayores probabilidades de mejorar mediante tratamientos menos costosos (Metcalfe y Ferguson, 2007b; Jeffcoate y cols., 2008; Buchberger y cols., 2010).

Durante las últimas décadas, los tratamientos tópicos con **factores de crecimiento** para la mejora de la cicatrización comprometida han sido objeto de extensa investigación. El objetivo de estas terapias experimentales es intentar restaurar los valores de estos mediadores claves de la cicatrización, cuyos niveles y funciones se encuentran alterados en este tipo de lesiones (Bennet y cols., 2003; Werner y Grose 2003; Menke y cols., 2007; Menke y cols., 2008; Eming y cols., 2010; Günter y Machens, 2012).

Para ello, se han investigado los efectos de la aplicación tópica de estos factores, y en algunos casos de su secuencia génica, en distintos modelos de cicatrización y estudios clínicos. Podemos encontrar entre estos trabajos aplicaciones tópicas de PDGF-BB (Wieman y cols., 1998; Margolis y cols., 2005), FGF1 (Huang y cols., 2011), FGF2 (Akasaka y cols., 2004; Uchi y cols., 2009), VEGF (Galiano y cols., 2004b), EGF (Tsang y cols., 2003; Dogan y cols., 2009; Fernández-Montequín y cols., 2009; Tuyet y cols., 2009), TGF- $\beta$ 1 (Pastar y cols., 2010; Pakyari y cols., 2013), TGF- $\beta$ 3 (Occleston y cols., 2011; Günter y Machens, 2012), HGF (Ono y cols., 2004a), PGF (Cianfarani y cols., 2006), CTGF (Henshaw y cols., 2015) y GM-CSF (Fang y cols., 2010), por citar solo algunos ejemplos. A esto hay que añadir estrategias que incluyen tratamientos con combinaciones de algunos de estos factores (Ono y cols., 2004b; Jazwa y cols., 2010), modificaciones de los mismos para aumentar su resistencia o unión a matriz (Lauer y cols., 2002; Roth y cols., 2006; Yan y cols., 2010) y diversos tipos de encapsulación para una mejor aplicación (Obara y cols., 2005; Alemdaroğlu y cols., 2006; Fujita y cols., 2007; Chu y cols., 2010; Judith y cols., 2010; Lee y cols., 2014; Mohandas y cols., 2015).

La mayoría de estos trabajos describen efectos positivos de los tratamientos sobre los parámetros del proceso cicatrizal contemplados en cada estudio. Sin embargo, muchos de ellos, tras la realización de pruebas clínicas, han dado resultados decepcionantes; tan solo la aplicación de PDGF-BB recombinante humano ha demostrado suficiente eficacia en estudios clínicos, siendo el único tratamiento de este tipo (Becaplermin – Regranex®) aprobado por la FDA (Menke y cols., 2007; Barrientos y cols., 2008; Menke y cols., 2008; Sen y Roy, 2008; Buchberger y cols., 2010; Günter y Machens, 2012).

Seguramente, el mayor problema sobre la eficacia de estos tratamientos sea el medio adverso en el que han de ser aplicados. Como ya se ha descrito, el ambiente marcadamente proteolítico de las heridas crónicas persistentes provoca una menor disponibilidad de factores de crecimiento debido a su rápida destrucción. Esto hace que su aplicación tópica sufra el mismo problema, por lo que para poder aumentar su eficacia han de aplicarse estrategias que protejan a estas proteínas (Barrientos y cols., 2008; Eming y Hubbell, 2011). En el caso de las úlceras asociadas a diabetes, las modificaciones causadas por la glicación suponen un problema adicional, tanto por las sufridas por los propios factores como por los receptores de los mismos, lo que causa



una reducción de su eficacia (Ahmed, 2005; Goldin y cols., 2006; Nishikori y cols., 2014). También ha de tenerse en cuenta que una aplicación tópica de factores de crecimiento sobre estas heridas puede no hallar una población celular adecuada y capaz de responder de manera correcta a este tratamiento (Falanga, 2005; Pastar y cols., 2010). Asimismo, no se pueden excluir los efectos sistémicos de la aplicación local de factores de crecimiento (Galiano y cols., 2004b). Existe además un problema adicional con estos tratamientos que ha de ser valorado cuidadosamente. El proceso de cicatrización presenta muchas similitudes con el cáncer, y es relativamente frecuente el desarrollo de tumores en zonas de heridas crónicas, principalmente debido a los procesos inflamatorios y estrés oxidativo descontrolados (Eming y cols., 2007a; Gurtner y cols., 2008; Schäfer y Werner 2008b). Debido a ello, la adición de factores de crecimiento puede suponer un estímulo adicional, por lo que su uso ha de plantearse con extrema precaución. Por ello, parece razonable que la estabilización de los factores de crecimiento intrínsecos a la propia herida, como favorecen las heparinas de los hidrogeles que hemos empleado, resulte una estrategia más segura que la adición de factores de crecimiento exógenos.

La búsqueda de tratamientos efectivos para su empleo en la curación de heridas crónicas y úlceras asociadas a diabetes ha seguido muchos otros caminos más allá de los expuestos hasta ahora, explorando la utilidad de diversas terapias, moléculas, dispositivos y estrategias de muy distinta naturaleza. Algunos ejemplos son el uso tópico de RAGE soluble (Goova y cols., 2001), las terapias con oxígeno (Asmis y cols., 2010) e hiperbáricas (Löndahl y cols., 2010), aunque la efectividad de esta última no resulta concluyente (Kranke y cols., 2012), el tratamiento con inhibidores de proteasas de forma tópica (Hoffman y cols., 2011) o vehiculizados en apósitos (Schönfelder y cols., 2005; Lobmann y cols., 2006), aplicación de fármacos como estatinas (Toker y cols., 2009) y beta-bloqueantes (Romana-Souza y cols., 2009), empleo de proteínas de diversa índole como fibronectina (Qiu y cols., 2007) o calreticulina (Greives y cols., 2012), preparados con remedios naturales y tradicionales como combinaciones de hierbas medicinales (Tam y cols., 2011) u hongos (Kwon y cols., 2009), terapias anti-ROS (Schäfer y Werner 2008a) incluyendo el uso de curcumina (Panchatcharam y cols., 2006), tratamientos con siRNA para inducir muerte celular selectiva (Kim y Yoo, 2013)

o inhibir apoptosis excesiva (Nguyen y cols., 2010), aplicación de vidrios bioactivos (Lin y cols., 2012), y la administración de péptidos con propiedades procicatrizantes (García-Honduvilla y cols., 2013; Tang y cols., 2014), entre muchas otras.

Un campo en el que se han realizado importantes avances recientemente es el de la implicación de las rutas relacionadas con el desarrollo en los procesos de reparación cutánea, especialmente de la ruta de señalización *hedgehog* (Le y cols., 2008; Brownell y cols., 2011; Bielefeld y cols., 2013). En los últimos años se han descrito disfunciones en esta ruta y en la actividad de su ligando más estudiado, Sonic hedgehog (Shh), asociadas a la patología diabética en los procesos de cicatrización. A este respecto se han llevado a cabo estudios en los que se ha demostrado una mejora de la cicatrización en modelos de diabetes mediante tratamientos orientados a la compensación de estas deficiencias (Asai y cols., 2006; Luo y cols., 2009; Dunaeva y cols., 2010; Dashti y cols., 2012; Park y cols., 2012; Wang y cols., 2013). El gran potencial de esta línea de investigación hace que su desarrollo para la obtención de posibles terapias avanzadas resulte de gran interés.

Durante décadas, la **heparina**, y posteriormente su derivado de bajo peso molecular, han sido utilizadas como anticoagulantes en la práctica clínica. Sin embargo, las características estructurales de estos glicosaminoglicanos y su capacidad de interacción con una gran variedad de moléculas provocan que tanto la UFH como las LMWH ofrezcan diversas aplicaciones en los campos del diseño de biomateriales, la oncología y la reparación de lesiones (Hirsh y Raschke, 2004; Peplow, 2005; Norrby, 2006; Hirsch y cols., 2007; Hochart y cols., 2008; Mousa, 2010).

El efecto de las heparinas en la cicatrización cutánea ha sido investigado en varios estudios, entre los que existen discrepancias. Civelek y cols. (2007) administraron dalteparina subcutánea en un modelo de cicatrización incisional en rata, concluyendo que existía un efecto negativo sobre el proceso. Sin embargo, estas asunciones se basaban en una mayor apoptosis y menor proliferación en el grupo tratado con LMWH a día 10, lo que puede explicarse como un estadio más avanzado de maduración y reducción de celularidad de la herida.

Apoyando el papel favorecedor de las heparinas en la cicatrización se encuentran estudios como el de [Hehenberger y cols. \(1998\)](#), en el que se observó una recuperación de la capacidad proliferativa en fibroblastos procedentes de úlceras de pacientes diabéticos gracias a la adición de heparina, o el de [Lakshmi y cols. \(2011\)](#), donde la aplicación de colágeno cargado con heparina mostró una reducción de la inflamación en un modelo cicatrizal de quemadura en rata. Existen además estudios clínicos en los que la administración subcutánea de LMWH (dalteparina) mejoró la cicatrización de úlceras en pacientes diabéticos ([Kalani y cols., 2003](#)). De manera similar, [Rullan y cols. \(2008\)](#) observaron una mejor cicatrización empleando bemiparina subcutánea en un estudio clínico sobre pacientes diabéticos. Sin embargo, este tipo de aplicaciones presentan desventajas, ya que causan efectos sistémicos y se necesitan unas dosis relativamente altas. La aplicación tópica, en cambio, permite una actividad local, con menor cantidad de heparinas, con la ventaja adicional que supone su presencia sobre el lecho de la herida en cuanto a la limitación de la inflamación y el potenciamiento de los factores de crecimiento ([Faham y cols., 1996](#); [Dandona y cols., 1999](#); [Nissen y cols., 1999](#); [Hochart y cols., 2008](#)), como se discute más adelante.

Debido a sus múltiples propiedades, tanto estructurales como funcionales, en los últimos años ha surgido un gran interés en la investigación y desarrollo de estrategias y biomateriales para su utilización en múltiples campos. En la bibliografía se han descrito diferentes tipos de encapsulación de las heparinas para aplicaciones variadas, entre las que se incluyen el empleo de micropartículas poliméricas para tratamiento de trombosis ([Oliveira y cols., 2011](#)) o para una posible administración oral ([Javot y cols., 2009](#); [Javot y cols., 2010](#)), nanogeles para prevención de fibrosis hepática ([Lee y cols., 2011](#)), matrices para regeneración ósea ([Lin y cols., 2008](#)), recubrimientos de xenoimplantes vasculares para impedir trombosis ([Wang y cols., 2007](#)) e hidrogeles funcionalizados para prevenir hiperplasia intimal ([Beamish y cols., 2009](#)), por citar solamente algunas de las más relevantes entre la multitud de ellas ([Liang y Kiick, 2014](#); [Sakiyama-Elbert, 2014](#)).

De manera adicional, además de su uso como ingrediente activo, se han empleado tanto heparina no fraccionada como de bajo peso molecular como componentes de la propia estructura de los biomateriales ([Liang y Kiick, 2014](#); [Sakiyama-Elbert, 2014](#)). Una

de las aplicaciones más frecuentes de las heparinas en la fabricación de este tipo de materiales es la de servir como portadora de factores de crecimiento. En este campo se han realizado múltiples estudios empleando distintos tipos de dispositivos y formulaciones (Yao y cols., 2006; Nie y cols., 2009; Sun y cols., 2009; Mori y cols., 2010; Zieris y cols., 2010; Whelan y cols., 2014), incluyendo aplicaciones para cicatrización cutánea, como hidrogeles de glicosaminoglicanos y heparina funcionalizados con FGF2 (Liu y cols., 2007), conjugados de fibrina-heparina cargados con FGF2 (Bhang y cols., 2011) o con plasma rico en plaquetas (Yang y cols., 2011),

Sin embargo, más allá de la capacidad de estos glicosaminoglicanos para funcionar como portadores de factores de crecimiento, en este estudio resulta clave el efecto protector y potenciador de su actividad que supone esta interacción. En las heridas asociadas a diabetes las funciones de los factores de crecimiento se ven alteradas principalmente por su destrucción debido al ambiente proteolítico (Lobmann y cols., 2002; Falanga, 2004; Gill y Parks, 2008) y por la pérdida de actividad causada glicosilación inespecífica (Goldin y cols., 2006; Peppas y cols., 2009). Las heparinas son capaces de interaccionar con factores de crecimiento cruciales, como los FGFs y VEGF, y se ha descrito cómo esta interacción provoca una resistencia a su destrucción proteolítica (Faham y cols., 1996; Peplow, 2005; Norrby y Nordenhem, 2010) y a su modificación por glicosilación no enzimática (Nissen y cols., 1999), por lo que resultan idóneas para ser utilizadas para la mejora de la cicatrización diabética. Una ventaja adicional de esta propiedad es que, al aumentar la vida media y actividad de factores de crecimiento endógenos, permite una mejor cicatrización sin necesidad de aportación exógena, evitando los posibles efectos negativos de esta administración, como se ha discutido previamente. De manera adicional, la acción antiinflamatoria de las heparinas ayuda a disminuir el daño provocado por la inflamación sostenida que presenta este tipo de lesiones, al reducir la actividad y el reclutamiento de leucocitos (Dandona y cols., 1999; Peplow, 2005; Hochart y cols., 2008).

En cuanto al tipo de heparina utilizado, las de bajo peso molecular presentan ventajas frente a sus precursores no fraccionados. Son preparaciones menos polidispersas, lo que hace que sus efectos sean más predecibles y menos variables, permitiendo una mejor dosificación. Su menor tamaño prolonga su vida media, facilitando el pautado

para su administración y pudiendo delegarlo en el propio paciente. Esta menor longitud de sus cadenas también provoca una actividad anti-FactorIIa más baja, reduciendo el riesgo de sangrado. Además, las LMWH han mostrado un menor riesgo de incidencias asociadas al uso de heparina, como la osteoporosis o la trombocitopenia inducida por heparina (Hirsh y Raschke, 2004; Merli y Groce, 2010; Mousa, 2010). Debido a ello, las heparinas de bajo peso molecular suponen una alternativa más segura a la heparina sin fraccionar, por lo que su uso en aplicaciones de reparación cutánea resultaría más adecuado, al presentar efectos similares sobre estos procesos.

La elección de la **bemiparina** en el desarrollo de este trabajo frente a otras heparinas de bajo peso molecular se debe al excelente perfil farmacológico que posee y a sus superiores características. Esta LMWH presenta un menor peso molecular medio que otras preparaciones de este tipo, por lo que su vida media es mayor y su ratio de actividad anti-FactorXa/anti-FactorIIa es menor, lo que provoca un menor riesgo de sangrado, y ha demostrado su eficacia y seguridad en varios estudios, mostrando mejores resultados que otras preparaciones (Chapman y Goa, 2003; Christidou y cols., 2005; Miras-Parra y cols., 2005; Martínez-González y Rodríguez, 2010; Ciccone y cols., 2014). Asimismo, aunque la penetración de las heparinas a través de la piel es baja, la bemiparina mostró mejores propiedades de permeabilidad frente a la heparina clásica y a otras LMWH, debido a la estructura química conferida por su método de despolimerización y al menor peso molecular que posee (Franzè y cols., 2015).

Con respecto a su papel en la cicatrización, un estudio de Rullan y cols. (2008) mostró una mejora de esta en pacientes diabéticos tras la aplicación de bemiparina subcutánea. Con resultados en este mismo sentido, ha sido recientemente publicado un estudio relacionado con esta Tesis Doctoral, en el cual se pone de manifiesto la capacidad de la bemiparina para mejorar la cicatrización comprometida (Reyes-Ortega y cols., 2015). En este trabajo, se desarrolló un sistema bifásico de liberación controlada y secuencial del péptido N-terminal de la proadrenomedulina y de nanopartículas de bemiparina, el cual fue aplicado en un modelo de cicatrización comprometida por isquemia en oreja de conejo. Los resultados obtenidos muestran una notable mejora en el proceso cicatrizal, poniendo de manifiesto la capacidad de la



bemiparina para actuar en coordinación con otras moléculas bioactivas, lo que abre un amplio abanico de oportunidades terapéuticas.

Dentro de los múltiples biomateriales disponibles en la actualidad, el **quitosano** es un notable candidato para ser empleado en aplicaciones de cicatrización cutánea. Sus características como biomaterial natural no tóxico y biodegradable son adecuadas para su uso sobre heridas. Sin embargo, sus principales ventajas provienen de sus actividades específicas sobre el proceso cicatrizal. Una de ellas es su actividad antimicrobiana, siendo efectivo contra hongos como *Candida spp*, bacterias Gram-positivas y, en menor medida, Gram-negativas (Dai y cols., 2011). El control de la infección resulta crucial en las úlceras asociadas a diabetes, en las que se ha descrito la presencia de múltiples tipos de microorganismos, así como la formación de biopelículas o “*biofilms*” (Scales y Huffnagle, 2013; Zhao y cols., 2013). La importancia de esta actividad radica en la mayor propensión de los pacientes diabéticos al desarrollo de infecciones debido a las roturas cutáneas, a alteraciones en la sudoración, a la elevada glucemia y a la existencia de una función leucocitaria comprometida (Greenhalgh, 2003; Acosta y cols., 2008). El efecto antimicrobiano del quitosano, unido a sus efectos potenciadores de la granulación y síntesis de matriz, y su capacidad para modular el proceso inflamatorio (Ueno y cols., 2001; Dai y cols., 2011; Azuma y cols., 2015) hacen de este polímero una muy útil herramienta en el tratamiento de úlceras diabéticas, cuya cicatrización muestra deficiencias en estos procesos (Greenhalgh, 2003; Falanga, 2005).

Las capacidades procicatrizantes del quitosano han sido comprobadas en diversos modelos. Algunos ejemplos son el uso de geles fotoentrecruzados (Ishihara y cols., 2002) y de membranas de quitosano y alginato (Caetano y cols., 2015) en modelos excisionales, hidrogeles físicos sobre úlceras por presión experimentales (Mayol y cols., 2014) y soluciones de quitosano sobre defectos incisionales (Minagawa y cols., 2007). Asimismo, se ha experimentado con la vehiculización de factores de crecimiento como el EGF en películas de quitosano (Lee y cols., 2014), PDGF en geles de colágeno y quitosano (Judith y cols., 2010) y VEGF en nanopartículas de quitosano y ácido hialurónico (Mohandas y cols., 2015). En estos trabajos se pusieron de manifiesto las propiedades favorecedoras del quitosano en procesos como la hemostasia, el control

de la inflamación, la epitelización, la angiogénesis y el aumento de resistencia mecánica del tejido cicatrizal.

Uno de los modelos experimentales en los que han sido más estudiadas las propiedades de este polímero es el de la quemadura cutánea, que ha sido abordado mediante el uso de películas de quitosano en combinación con antibiótico (Aoyagi y cols., 2007), o aplicando distintos hidrogeles, tanto sin funcionalizar (Boucard y cols., 2007; Alsarra, 2009; Nascimento y cols., 2009; Ribeiro y cols., 2009) como cargados con medio de cultivo (Kiyozumi y cols., 2007), o factores de crecimiento (Alemdaroğlu y cols., 2006), entre otras muchas formulaciones (Dai y cols., 2011; Azuma y cols., 2015). Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que este tipo de lesiones no comparte las alteraciones presentes en las heridas asociadas a la diabetes, por lo que la efectividad de estas preparaciones podría no ser suficiente para lograr una mejor cicatrización en estas condiciones.

En un trabajo de Obara y cols. (2005) se evaluó la acción de geles cargados con FGF2 sobre un modelo de cicatrización diabética en ratones db/db. Los autores emplearon hidrogeles entrecruzables mediante radiación ultravioleta, similar al usado por Ishihara y cols. (2002), al que añadieron FGF2, observando una mejora de la granulación y la vascularización de defectos excisionales. No obstante, el estudio solamente alcanza los 16 días, por lo que no es posible evaluar los efectos a largo plazo de este tipo de funcionalización sobre la remisión de la fase proliferativa necesaria para la maduración tisular.

Debido a la favorable interacción iónica entre el quitosano y la heparina (Peplow, 2005) se han diseñado diversas preparaciones empleando ambos componentes, como nanoconstructos para administración oral de LMWH (Paliwal y cols., 2012) o criogeles con nanopartículas de quitosano/bemiparina (Peniche y cols., 2013). Además de su empleo como agente encapsulante, se han realizado estudios sobre el empleo de quitosano y quitosano modificado catiónicamente como neutralizadores de la acción anticoagulante de la heparina, en sustitución del sulfato de protamina (Kamiński y cols., 2010).

Un tipo de aplicación de conjugados de quitosano y heparina en cicatrización cutánea fue descrita por [Kratz y cols. \(1998\)](#). En este estudio, a pacientes sometidos a autoinjertos cutáneos les fueron aplicadas membranas de quitosano y heparina sobre los defectos de grosor parcial realizados como fuente del injerto. Los autores observaron una mejor epitelización de la zona cubierta con la membrana, aunque no se valoraron más aspectos del proceso reparativo, siendo además el tipo de lesión utilizada poco representativa de lesiones comprometidas.

En un modelo de cicatrización excisional en rata, [Kweon y cols. \(2003\)](#) utilizaron un hidrogel de quitosano soluble en agua acompañado con heparina. Este grupo observó una disminución del defecto 15 días después de la realización del mismo en comparación con heridas descubiertas, argumentando una regeneración de la piel, incluidos los anexos cutáneos. Esta afirmación resulta cuestionable, ya que posiblemente sus observaciones correspondan tan solo a una mayor aproximación de los bordes causada por la contracción de la herida, como se observa en sus imágenes. Aunque las diferencias entre los grupos resultan interesantes, sería necesario un estudio más detallado del tejido, así como de otros tiempos de estudio para valorar el proceso cicatrizal.

[Fujita y cols. \(2004\)](#) desarrollaron hidrogeles de quitosano y heparinoide (heparina oxidada con peryodato) cargados con FGF2, demostrando su capacidad angiogénica en un modelo subcutáneo. En un trabajo posterior ([Fujita y cols., 2007](#)) emplearon ese mismo hidrogel mediante inyección subcutánea en modelos de ratón db/db y de isquemia de extremidad en rata. Sin embargo, la evaluación realizada en estos trabajos resulta incompleta, pues tan solo tienen en cuenta el aumento en la angiogénesis, cuya medida realizan de forma indirecta mediante la determinación de la cantidad de hemoglobina, con un análisis tisular limitado a la observación de neutrófilos degradando el hidrogel y de “la formación de una pleura lisa y brillante alrededor del hidrogel”. Aunque la capacidad angiogénica de estos preparados resulta interesante, la falta de datos sobre sus efectos más allá de la vascularización hace que se planteen dudas sobre su seguridad y actividad al tener en cuenta la adición de un factor de crecimiento, especialmente uno tan pleiotrópico como el FGF2. Asimismo, aunque hablan del ratón db/db como un modelo de reparación comprometida, la aplicación

subcutánea en ausencia de lesión no supone un modelo de cicatrización que permita valorar su efecto real.

Por último, el hecho de que existan tantas aproximaciones experimentales distintas con las que se observa algún grado de mejora sobre la cicatrización diabética pone de manifiesto la complejidad de la alteración de los procesos reparativos causados por esta patología. Esto hace que para lograr alcanzar una adecuada efectividad en el tratamiento de las úlceras en pacientes diabéticos, las terapias a desarrollar necesiten ser multifacéticas (Menke y cols., 2007; Sen y Roy, 2008).

## 5.8 CONSIDERACIONES FINALES

Durante el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo el diseño, aplicación y evaluación de un dispositivo de aplicación tópica para la mejora de la cicatrización comprometida por diabetes.

Los hidrogeles de quitosano funcionalizados con heparina sin fraccionar o bemiparina mostraron excelentes características para su empleo sobre este tipo de lesiones. La mejora global observada en el proceso cicatrizal debida a su aplicación resulta muy interesante, ya que estos hidrogeles fueron capaces de producir cambios beneficiosos en los procesos característicamente alterados en estas lesiones, como la inflamación descontrolada y la falta de progresión de la herida (Greenhalgh, 2003; Jeffcoate y Harding, 2003; Falanga, 2005; Wicks y cols., 2014). A esto ha de añadirse la ausencia de efectos tóxicos, la facilidad y versatilidad de su aplicación, y el bajo coste de su preparación. Todo ello hace que estos apósitos de hidrogel puedan ser planteados como una alternativa de gran utilidad en el tratamiento de las úlceras asociadas a diabetes.

Actualmente, las recomendaciones para el tratamiento de las úlceras en pacientes diabéticos siguen un protocolo general de control de la evolución de la herida, desbridamiento, tratamiento con antibióticos para evitar infecciones y descarga, en caso de ser necesaria. En aquellas heridas que no demuestran progresión se plantea el empleo de terapias avanzadas (como factores de crecimiento o terapia celular) o más a

largo plazo la cirugía reconstructiva (Brem y cols., 2006). Los hidrogeles diseñados en el presente trabajo podrían suponer una importante aportación al arsenal del que se dispone para el tratamiento de estas lesiones. La ausencia de componentes que requieran una consideración especial para su uso, como células o factores de crecimiento, su fácil aplicación y adaptabilidad a las distintas heridas, así como su coste reducido hacen que estos dispositivos presenten serie de ventajas frente a otras terapias avanzadas. Debido a ello, se presentan como grandes candidatos para su aplicación en el tratamiento general de las úlceras asociadas a diabetes. No obstante, es necesario el desarrollo de estudios clínicos para corroborar su efectividad y seguridad en su uso sobre humanos.

Resulta interesante el hecho de que los procesos cicatrizales en los grupos de estudio, que tras su análisis microscópico demostraron importantes diferencias en su progresión y calidad, mostraran valores similares en la morfometría macroscópica. En un reciente estudio de Park y cols. (2014) se observó un efecto similar, en el que las heridas de ratones sanos y db/db inmovilizadas mediante marcos de silicona no mostraron diferencias en el cierre, pero sí en la evaluación histológica. De manera similar, otros trabajos sobre cicatrización han encontrado importantes diferencias en el proceso reparativo al analizar el tejido pese a haberse observado porcentajes de cierre macroscópico similares a tiempos largos entre los grupos de estudio (Kiyozumi y cols., 2007; Caetano y cols., 2015). Esto pone de manifiesto la gran importancia de una evaluación integral del proceso de cicatrización, especialmente en la investigación con modelos murinos, cuyas diferencias fisiológicas con el humano pueden conducir a conclusiones erróneas si solamente se evalúan ciertos aspectos del proceso de reparación. Puesto que la finalidad última de este tipo de estudios es conseguir una aplicación traslacional al ámbito clínico, las diferencias y limitaciones de los distintos modelos han de ser cuidadosamente valoradas (Lindblad, 2006), con el objetivo de extraer la mayor cantidad de información útil de los experimentos realizados.

Una característica observada frecuentemente en los estudios presentes en la literatura es la evaluación del proceso cicatrizal mediante el análisis de algún proceso aislado, como proliferación celular o angiogénesis, y/o de tiempos de estudio puntuales. La cicatrización es un fenómeno continuo que comprende múltiples mecanismos y

procesos coordinados, cuya actividad fluctúa a lo largo del tiempo siguiendo patrones de inducción y remisión (Greenhalgh, 1998; Singer y Clark, 1999; Falanga, 2005; Li y cols., 2007; Gurtner y cols., 2008; Menke y cols., 2008). Debido a ello, una evaluación puntual puede no reflejar adecuadamente la calidad del proceso reparativo, siendo necesario estudiar los procesos de cicatrización de una manera global y continua tanto para profundizar en el conocimiento de los mismos como para evaluar estrategias para su favorecimiento. Por ello, nuestro trabajo comprende una serie de tiempos de estudio dentro del periodo que consideramos crítico en el desarrollo del proceso cicatrizal. Del mismo modo, ha de tenerse en cuenta la gran importancia de un adecuado conocimiento del modelo empleado y de una correcta recogida y procesamiento de las muestras para lograr alcanzar conclusiones fiables, evitando en la medida de lo posible sobreestimaciones y/o infravaloraciones de los parámetros estudiados.

Es importante tener en cuenta que, aunque los hidrogeles HEP y BEM fueron capaces de mejorar la cicatrización en comparación con la ausencia de tratamiento o la aplicación de hidrogeles placebo, la respuesta observada no consiguió igualar a la que mostró el grupo control sano. Esto pone de manifiesto la extraordinaria complejidad de las alteraciones que la diabetes causa sobre el proceso de cicatrización a distintos niveles (Greenhalgh, 2003; Brownlee, 2005; Falanga, 2005; Goldin y cols., 2006; Peppas y cols., 2009; Berlanga-Acosta y cols., 2010; Wicks y cols., 2014). Debido a ello, el empleo de diferentes terapias y estrategias puede ser capaz de mejorar el proceso reparativo y conseguir un cierre de la herida, pero nunca será capaz de revertir todos los impedimentos y efectos negativos que una alteración metabólica sistémica como la diabetes mellitus produce sobre la cicatrización cutánea. Puesto que las complicaciones asociadas a la diabetes, incluyendo la formación de úlceras, tienen como principal causa el metabolismo glucídico alterado y la consecuente glucemia elevada (Brownlee, 2005; Berlanga-Acosta y cols., 2010), el control sistemático por parte del paciente de los niveles sanguíneos de glucosa resulta crucial para limitar la formación de AGEs y reducir la aparición de complicaciones asociadas a ellos (Greenhalgh, 2003; Jeffcoate y cols., 2004; Chen y cols., 2009b; Peppas y cols., 2009).



En este estudio, los hidrogeles funcionalizados con heparina sin fraccionar y con bemiparina no mostraron diferencias significativas entre ellos en su acción favorecedora de la cicatrización en el modelo de diabetes experimental. Debido a ello, ambas formulaciones podrían ser empleadas para el tratamiento de úlceras de pacientes diabéticos, ya que los dos tipos de hidrogel han mostrado efectos beneficiosos sobre el proceso reparativo. Por ello, ante esta ausencia de diferencias, la elección de uno de los tipos de heparina debería hacerse atendiendo a las propiedades de las mismas. Como ya se ha expuesto anteriormente, las heparinas de bajo peso molecular, y especialmente la bemiparina, poseen ciertas características ventajosas frente a las heparinas no fraccionadas. Son preparaciones con distribuciones de tamaños moleculares mucho más definidas, con una menor longitud media de cadena, lo que provoca una actividad más estable y predecible y un menor riesgo de complicaciones como la hemorragia o la trombocitopenia inducida por heparina (Hirsh y Raschke, 2004; Merli y Groce, 2010; Mousa, 2010). Esto es especialmente cierto en el caso de la bemiparina, cuya composición química y menor tamaño le confieren propiedades farmacológicas superiores a otras LMWH (Chapman y Goa, 2003; Christidou y cols., 2005; Ciccone y cols., 2014), como se ha expuesto previamente. Debido a ello, y ante la similar respuesta procicatrizante observada, la elección entre los dos sistemas empleados en este trabajo de Tesis Doctoral sería el uso de hidrogeles funcionalizados con bemiparina, frente a los cargados con heparina sin fraccionar.

# CONCLUSIONES



## 6 CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos extraer las siguientes conclusiones:

- Los hidrogeles de quitosano cargados con heparina no fraccionada o con bemiparina provocan una mejora de los procesos de cicatrización comprometida asociada a diabetes en el modelo experimental utilizado: favorecen la remisión de la inflamación, promueven el avance del proceso reparativo e inducen la formación de un tejido cicatrizal de mayor calidad.
- El efecto beneficioso observado sobre la cicatrización tras la aplicación de hidrogeles de quitosano cargados con bemiparina o con heparina no fraccionada es similar.

Estas conclusiones nos permiten, por tanto, elevar nuestra **hipótesis** a la categoría de **TESIS**, afirmando que:

***El empleo de hidrogeles de quitosano funcionalizados con bemiparina (heparina de bajo peso molecular) y heparina no fraccionada mejoran la cicatrización comprometida asociada a la diabetes en un modelo experimental de cicatrización en rata diabética.***



## **CONCLUSIONS**





## 7 CONCLUSIONS

From the results obtained, the following **conclusions** can be drawn:

- The chitosan hydrogels loaded with unfractionated heparin or with bemiparin cause an improvement in the diabetes-associated impaired wound healing processes, in the experimental model used: favoring the remission of inflammation, promoting the progression of the reparative process and inducing the formation of a higher quality cicatricial tissue.
- The beneficial effect upon healing observed after the application of chitosan hydrogels loaded with bemiparin or unfractionated heparin was similar.

Based on these findings, we were able to raise our starting **hypothesis** to the category of **THESIS** and conclude that:

***The use of chitosan hydrogels functionalized with bemiparin (low molecular weight heparin) and unfractionated heparin improves the impaired wound healing associated to diabetes, in an experimental model of wound healing in the diabetic rat.***



## **BIBLIOGRAFÍA**



## 8 BIBLIOGRAFÍA

Acosta JB, del Barco DG, Vera DC, Savigne W, Lopez-Saura P, Guillen Nieto G, Schultz GS. *The pro-inflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds*. Int Wound J. 2008 Oct; 5(4): 530-9.

Ahmed N. *Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications*. Diabetes Res Clin Pract. 2005 Jan; 67(1): 3-21.

Akasaka Y, Ono I, Yamashita T, Jimbow K, Ishii T. *Basic fibroblast growth factor promotes apoptosis and suppresses granulation tissue formation in acute incisional wounds*. J Pathol. 2004 Jun; 203(2): 710-20.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula*. 5ª ed. Barcelona: Ediciones Omega; 2010. p. 1131-1204.

Al-Mashat HA, Kandru S, Liu R, Behl Y, Desta T, Graves DT. *Diabetes enhances mRNA levels of proapoptotic genes and caspase activity, which contribute to impaired healing*. Diabetes. 2006 Feb; 55(2): 487-95.

Alemdaroğlu C, Değim Z, Celebi N, Zor F, Oztürk S, Erdoğan D. *An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor*. Burns. 2006 May; 32(3): 319-27.

Alsarra IA. *Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds*. Int J Biol Macromol. 2009 Jul 1; 45(1): 16-21.

Amos PJ, Kapur SK, Stapor PC, Shang H, Bekiranov S, Khurgel M, Rodeheaver GT, Peirce SM, Katz AJ. *Human adipose-derived stromal cells accelerate diabetic wound healing: impact of cell formulation and delivery*. Tissue Eng Part A. 2010 May; 16(5): 1595-606.

Ansell DM, Holden KA, Hardman MJ. *Animal models of wound repair: Are they cutting it?* Exp Dermatol. 2012 Aug; 21(8): 581-5.

Antsiferova M, Martin C, Huber M, Feyerabend TB, Förster A, Hartmann K, Rodewald HR, Hohl D, Werner S. *Mast cells are dispensable for normal and activin-promoted wound healing and skin carcinogenesis*. J Immunol. 2013 Dec 15; 191(12): 6147-55.



Aoyagi S, Onishi H, Machida Y. *Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds*. Int J Pharm. 2007 Feb 7; 330(1-2): 138-45.

Ariel A, Timor O. *Hanging in the balance: endogenous anti-inflammatory mechanisms in tissue repair and fibrosis*. J Pathol. 2013 Jan; 229(2): 250-63.

Artlett CM. *Inflammasomes in wound healing and fibrosis*. J Pathol. 2013 Jan; 229(2): 157-67.

Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. *Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis*. J Exp Med. 2007 May 14; 204(5): 1057-69.

Asai J, Takenaka H, Kusano KF, Li M, Luedemann C, Curry C, Eaton E, Iwakura A, Tsutsumi Y, Hamada H, Kishimoto S, Thorne T, Kishore R, Losordo DW. *Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling*. Circulation. 2006 May 23; 113(20): 2413-24.

Asmis R, Qiao M, Zhao Q. *Low flow oxygenation of full-excisional skin wounds on diabetic mice improves wound healing by accelerating wound closure and reepithelialization*. Int Wound J. 2010 Oct; 7(5): 349-57.

Azuma K, Izumi R, Osaki T, Ifuku S, Morimoto M, Saimoto H, Minami S, Okamoto Y. *Chitin, chitosan, and its derivatives for wound healing: old and new materials*. J Funct Biomater. 2015 Mar 13; 6(1): 104-42.

Bannon P, Wood S, Restivo T, Campbell L, Hardman MJ, Mace KA. *Diabetes induces stable intrinsic changes to myeloid cells that contribute to chronic inflammation during wound healing in mice*. Dis Model Mech. 2013 Nov; 6(6): 1434-47.

Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. *The role of vascular endothelial growth factor in wound healing*. J Surg Res. 2009 May 15; 153(2): 347-58.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. *Growth factors and cytokines in wound healing*. Wound Repair Regen. 2008 Sep-Oct; 16(5): 585-601.

Bayat A, McGrouther DA, Ferguson MW. *Skin scarring*. BMJ. 2003 Jan 11; 326(7380): 88-92.

Beamish JA, Geyer LC, Haq-Siddiqi NA, Kottke-Marchant K, Marchant RE. *The effects of heparin releasing hydrogels on vascular smooth muscle cell phenotype*. Biomaterials. 2009 Oct; 30(31): 6286-94.

Beldon P. *Basic science of wound healing*. Surgery (Oxford). 2010; 28(9): 409-412.

Bellavia G, Fasanaro P, Melchionna R, Capogrossi MC, Napolitano M. *Transcriptional control of skin reepithelialization*. J Dermatol Sci. 2014 Jan; 73(1): 3-9.

Bennett SP, Griffiths GD, Schor AM, Leese GP, Schor SL. *Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers*. Br J Surg. 2003 Feb; 90(2): 133-46.

Berlanga J, Cibrian D, Guillén I, Freyre F, Alba JS, Lopez-Saura P, Merino N, Aldama A, Quintela AM, Triana ME, Montequin JF, Ajamieh H, Urquiza D, Ahmed N, Thornalley PJ. *Methylglyoxal administration induces diabetes-like microvascular changes and perturbs the healing process of cutaneous wounds*. Clin Sci (Lond). 2005 Jul; 109(1): 83-95.

Berlanga-Acosta J, Valdéz-Pérez C, Savigne-Gutiérrez W, Mendoza-Marí Y, Franco-Pérez N, Vargas-Machiran E, Poll-Marrón N, Álvarez-Duarte H, Echeverría-Requeijo H, Pérez-Aguilar RM. *Cellular and molecular insights into the wound healing mechanism in diabetes*. Biotecnología Aplicada. 2010; 27: 255-261.

Bhang SH, Sun AY, Yang HS, Rhim T, Kim DI, Kim BS. *Skin regeneration with fibroblast growth factor 2 released from heparin-conjugated fibrin*. Biotechnol Lett. 2011 Apr; 33(4): 845-51.

Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. *Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration*. Cell Mol Life Sci. 2013 Jun; 70(12): 2059-81.

Blakytyn R, Jude E. *The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes*. Diabet Med. 2006 Jun; 23(6): 594-608.

Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. *Wound healing dressings and drug delivery systems: a review*. J Pharm Sci. 2008 Aug; 97(8): 2892-923.

Bolzán AD, Bianchi MS. *Genotoxicity of streptozotocin*. Mutat Res. 2002 Dec; 512(2-3): 121-34.

Boo S, Dagnino L. *Integrins as Modulators of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Dermal Fibroblasts During Skin Regeneration After Injury*. Adv Wound Care (New Rochelle). 2013 Jun; 2(5): 238-246.

Boucard N, Viton C, Agay D, Mari E, Roger T, Chancerelle Y, Domard A. *The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns*. Biomaterials. 2007 Aug; 28(24): 3478-88.

Brandner JM, Zacheja S, Houdek P, Moll I, Lobmann R. *Expression of matrix metalloproteinases, cytokines, and connexins in diabetic and nondiabetic human keratinocytes before and after transplantation into an ex vivo wound-healing model*. Diabetes Care. 2008 Jan; 31(1): 114-20.

Brem H, Sheehan P, Rosenberg HJ, Schneider JS, Boulton AJ. *Evidence-based protocol for diabetic foot ulcers*. Plast Reconstr Surg. 2006 Jun; 117(7 Suppl): 193S-209S.

Brem H, Tomic-Canic M. *Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes*. J Clin Invest. 2007 May; 117(5): 1219-22.

Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. *Wound healing: an overview*. Plast Reconstr Surg. 2006 Jun; 117(7 Suppl): 1e-S-32e-S.

Brouwers O, Niessen PM, Ferreira I, Miyata T, Scheffer PG, Teerlink T, Schrauwen P, Brownlee M, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. *Overexpression of glyoxalase-I reduces hyperglycemia-induced levels of advanced glycation end products and oxidative stress in diabetic rats*. J Biol Chem. 2011 Jan 14; 286(2): 1374-80.

Brown DL, Kao WW, Greenhalgh DG. *Apoptosis down-regulates inflammation under the advancing epithelial wound edge: delayed patterns in diabetes and improvement with topical growth factors*. Surgery. 1997 Apr; 121(4): 372-80.

Brownell I, Guevara E, Bai CB, Loomis CA, Joyner AL. *Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells*. Cell Stem Cell. 2011 May 6; 8(5): 552-65.

Brownlee M. *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature. 2001 Dec 13; 414(6865): 813-20.

Brownlee M. *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism*. Diabetes. 2005 Jun; 54(6): 1615-25.

Brüel A, Cristensen EI, Qvortrup K, Trandum-Jensen J, Geneser F. *Geneser Histología*. 4ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2014. p. 437.

Buchberger B, Follmann M, Freyer D, Huppertz H, Ehm A, Wasem J. *The importance of growth factors for the treatment of chronic wounds in the case of diabetic foot ulcers*. GMS Health Technol Assess. 2010 Sep 1; 6: Doc12.

Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. *Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation*. Trends Immunol. 2001 Apr; 22(4): 199-204.

Buján J, Pascual G, Corrales C, Gómez-Gil V, García-Honduvilla N, Bellón JM. *Muscle-derived stem cells used to treat skin defects prevent wound contraction and expedite reepithelialization*. Wound Repair Regen. 2006 Mar-Apr; 14(2): 216-23.

Burns JL, Mancoll JS, Phillips LG. *Impairments to wound healing*. Clin Plast Surg. 2003 Jan; 30(1): 47-56.

Caetano GF, Frade MA, Andrade TA, Leite MN, Bueno CZ, Moraes ÂM, Ribeiro-Paes JT. *Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2015 Jul; 103(5): 1013-22.

Carroll LA, Koch RJ. *Heparin stimulates production of bFGF and TGF-beta 1 by human normal, keloid, and fetal dermal fibroblasts*. Med Sci Monit. 2003 Mar; 9(3): BR97-108.

Cavallini M. *Autologous fibroblasts to treat deep and complicated leg ulcers in diabetic patients*. Wound Repair Regen. 2007 Jan-Feb; 15(1): 35-8.

Cha J, Falanga V. *Stem cells in cutaneous wound healing*. Clin Dermatol. 2007 Jan-Feb; 25(1): 73-8.

Chapman TM, Goa KL. *Bemiparin: a review of its use in the prevention of venous thromboembolism and treatment of deep vein thrombosis*. Drugs. 2003; 63(21): 2357-77.

Chen L, Schrementi ME, Ranzer MJ, Wilgus TA, DiPietro LA. *Blockade of mast cell activation reduces cutaneous scar formation*. PLoS One. 2014 Jan 22; 9(1): e85226.

Chen M, Przyborowski M, Berthiaume F. *Stem cells for skin tissue engineering and wound healing*. Crit Rev Biomed Eng. 2009a; 37(4-5): 399-421.

Chen X, Lin W, Lu S, Shi Y, Zou J, Liu Z, Liao W. *Insulin prevents latent skin lesions by inhibiting the generation of advanced glycation end products in streptozotocin-induced diabetic rats*. Endocr Pathol. 2009b Fall; 20(3): 163-9.

Chomczynski P, Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem. 1987; 162(1): 156-9.

Christidou FN, Frangia TK, Bamichas GI, Gionanlis LC, Natse TA, Georgoulis IE, Sombolos KI. *Comparison of two low-molecular weight heparins (LMWHs), tinzaparin and bemiparin, during hemodialysis*. Int J Clin Pharmacol Ther. 2005 Jul; 43(7): 335-8.

Chu Y, Yu D, Wang P, Xu J, Li D, Ding M. *Nanotechnology promotes the full-thickness diabetic wound healing effect of recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats*. Wound Repair Regen. 2010 Sep-Oct; 18(5): 499-505.

Cianfarani F, Zambruno G, Brogelli L, Sera F, Lacal PM, Pesce M, Capogrossi MC, Failla CM, Napolitano M, Odorisio T. *Placenta growth factor in diabetic wound healing: altered expression and therapeutic potential*. Am J Pathol. 2006 Oct; 169(4): 1167-82.

Ciccone MM, Cortese F, Corbo F, Corrales NE, Al-Momen AK, Silva A, Zito A, Pinto M, Gesualdo M, Scicchitano P. *Bemiparin, an effective and safe low molecular weight heparin: a review*. Vascuol Pharmacol. 2014 Jul; 62(1): 32-7.

Civelek A, Ak K, Kurtkaya O, Tekeli A, Isbir S, Nargileci E, Arsan S, Sav A. *Effect of a low molecular weight heparin molecule, dalteparin, on cellular apoptosis and inflammatory process in an incisional wound-healing model*. Surg Today. 2007; 37(5): 406-11.

Clark RA, Ghosh K, Tonnesen MG. *Tissue engineering for cutaneous wounds*. J Invest Dermatol. 2007 May; 127(5): 1018-29.

Conway K, Ruge F, Price P, Harding KG, Jiang WG. *Hepatocyte growth factor regulation: an integral part of why wounds become chronic*. Wound Repair Regen. 2007 Sep-Oct; 15(5): 683-92.

Corr DT, Hart DA. *Biomechanics of Scar Tissue and Uninjured Skin*. Adv Wound Care (New Rochelle). 2013 Mar; 2(2): 37-43.

Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. *Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects*. Expert Rev Anti Infect Ther. 2011 Jul; 9(7): 857-79.

Daley JM, Reichner JS, Mahoney EJ, Manfield L, Henry WL Jr, Mastrofrancesco B, Albina JE. *Modulation of macrophage phenotype by soluble product(s) released from neutrophils*. J Immunol. 2005 Feb 15; 174(4): 2265-72.

Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, Reichner JS, Albina JE. *The phenotype of murine wound macrophages*. J Leukoc Biol. 2010 Jan; 87(1): 59-67.

Dandona P, Qutob T, Hamouda W, Bakri F, Aljada A, Kumbkarni Y. *Heparin inhibits reactive oxygen species generation by polymorphonuclear and mononuclear leucocytes*. Thromb Res. 1999 Dec 15; 96(6): 437-43.

Dashti M, Peppelenbosch MP, Rezaee F. *Hedgehog signalling as an antagonist of ageing and its associated diseases*. Bioessays. 2012 Oct; 34(10): 849-56.

Davidson JM, Yu F2, Opalenik SR. *Splinting Strategies to Overcome Confounding Wound Contraction in Experimental Animal Models*. Adv Wound Care (New Rochelle). 2013 May; 2(4): 142-148.



Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. *Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts*. J Cell Biol. 1993 Jul; 122(1): 103-11.

Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. *Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar*. Am J Pathol. 1995 Jan; 146(1): 56-66.

Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. *Tissue repair, contraction, and the myofibroblast*. Wound Repair Regen. 2005 Jan-Feb; 13(1): 7-12.

Dinh TL, Veves A. *The efficacy of Apligraf in the treatment of diabetic foot ulcers*. Plast Reconstr Surg. 2006 Jun; 117(7 Suppl): 152S-157S.

Dogan S, Demirer S, Kepenekci I, Erkek B, Kiziltay A, Hasirci N, Müftüoğlu S, Nazikoglu A, Renda N, Dincer UD, Elhan A, Kuterdem E. *Epidermal growth factor-containing wound closure enhances wound healing in non-diabetic and diabetic rats*. Int Wound J. 2009 Apr; 6(2): 107-15.

Dorsett-Martin WA. *Rat models of skin wound healing: a review*. Wound Repair Regen. 2004 Nov-Dec; 12(6): 591-9.

Dovi JV, He LK, DiPietro LA. *Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice*. J Leukoc Biol. 2003 Apr; 73(4): 448-55.

Dovi JV, Szpadarska AM, DiPietro LA. *Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury?* Thromb Haemost. 2004 Aug; 92(2): 275-80.

Dunaeva M, Voo S, van Oosterhoud C, Waltenberger J. *Sonic hedgehog is a potent chemoattractant for human monocytes: diabetes mellitus inhibits Sonic hedgehog-induced monocyte chemotaxis*. Basic Res Cardiol. 2010 Jan; 105(1): 61-71.

Duraisamy Y, Slevin M, Smith N, Bailey J, Zweit J, Smith C, Ahmed N, Gaffney J. *Effect of glycation on basic fibroblast growth factor induced angiogenesis and activation of associated signal transduction pathways in vascular endothelial cells: possible relevance to wound healing in diabetes*. Angiogenesis. 2001; 4(4): 277-88.

Eckes B, Nischt R, Krieg T. *Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring*. Fibrogenesis Tissue Repair. 2010 Mar 11; 3: 4.

Egozi EI, Ferreira AM, Burns AL, Gamelli RL, Dipietro LA. *Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds*. Wound Repair Regen. 2003 Jan-Feb; 11(1): 46-54.

Ehrlich HP, Hunt TK. *Collagen Organization Critical Role in Wound Contraction*. Adv Wound Care (New Rochelle). 2012 Feb; 1(1): 3-9.

Ehrlich HP. *A Snapshot of Direct Cell-Cell Communications in Wound Healing and Scarring*. Adv Wound Care (New Rochelle). 2013 May; 2(4): 113-121.

Eming SA, Krieg T. *Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair*. J Invest Dermatol Symp Proc. 2006 Sep; 11(1): 79-86.

Eming SA, Smola-Hess S, Kurschat P, Hirche D, Krieg T, Smola H. *A novel property of povidon-iodine: inhibition of excessive protease levels in chronic non-healing wounds*. J Invest Dermatol. 2006 Dec; 126(12): 2731-3.

Eming SA, Krieg T, Davidson JM. *Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms*. J Invest Dermatol. 2007a Mar; 127(3): 514-25.

Eming SA, Werner S, Bugnon P, Wickenhauser C, Siewe L, Utermöhlen O, Davidson JM, Krieg T, Roers A. *Accelerated wound closure in mice deficient for interleukin-10*. Am J Pathol. 2007b Jan; 170(1): 188-202.

Eming SA, Koch M, Krieger A, Brachvogel B, Kreft S, Bruckner-Tuderman L, Krieg T, Shannon JD, Fox JW. *Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds*. J Proteome Res. 2010 Sep 3; 9(9): 4758-66.

Eming SA, Hubbell JA. *Extracellular matrix in angiogenesis: dynamic structures with translational potential*. Exp Dermatol. 2011 Jul; 20(7): 605-13.

Enoch S, Leaper DJ. *Basic science of wound healing*. Surgery (Oxford). 2005; 23(2): 37-42.

Ergul E, Ozgun YM, Kiyak G, Barit Ozgun G, Korukluoglu B, Kusdemir A. *Does low molecular weight heparin impair anastomotic wound healing?* J Gastrointest Surg. 2009 Apr; 13(4): 798-803.

Faham S, Hileman RE, Fromm JR, Linhardt RJ, Rees DC. *Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor.* Science. 1996 Feb 23; 271(5252): 1116-20.

Falanga V. *The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation.* Blood Cells Mol Dis. 2004 Jan-Feb; 32(1): 88-94.

Falanga V. *Wound healing and its impairment in the diabetic foot.* Lancet. 2005 Nov 12; 366 (9498): 1736-43.

Fang Y, Shen J, Yao M, Beagley KW, Hambly BD, Bao S. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances wound healing in diabetes via upregulation of proinflammatory cytokines.* Br J Dermatol. 2010 Mar; 162(3): 478-86.

Fernández-Montequín JI, Valenzuela-Silva CM, Díaz OG, Savigne W, Sancho-Soutelo N, Rivero-Fernández F, Sánchez-Penton P, Morejón-Vega L, Artaza-Sanz H, García-Herrera A, González-Benavides C, Hernández-Cañete CM, Vázquez-Proenza A, Berlanga-Acosta J, López-Saura PA; Cuban Diabetic Foot Study Group. *Intra-lesional injections of recombinant human epidermal growth factor promote granulation and healing in advanced diabetic foot ulcers: multicenter, randomised, placebo-controlled, double-blind study.* Int Wound J. 2009 Dec; 6(6): 432-43.

Fernández Pavón A. *Farmacología de Bemiparina.* Emergencias. 2004; 15: S2-S4.

Ferrante CJ, Leibovich SJ. *Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing.* Adv Wound Care (New Rochelle). 2012 Feb; 1(1): 10-16.

Finnson KW, McLean S, Di Guglielmo GM, Philip A. *Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring.* Adv Wound Care (New Rochelle). 2013 Jun; 2(5): 195-214.

Frank S, Madlener M, Werner S. *Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing*. J Biol Chem. 1996 Apr 26; 271(17): 10188-93.

Franzè S, Gennari CG, Minghetti P, Cilurzo F. *Influence of chemical and structural features of low molecular weight heparins (LMWHs) on skin penetration*. Int J Pharm. 2015 Mar 15; 481(1-2): 79-83.

Fujita M. *Heparin and angiogenic therapy*. Eur Heart J. 2000 Feb; 21(4): 270-4.

Fujita M, Ishihara M, Simizu M, Obara K, Ishizuka T, Saito Y, Yura H, Morimoto Y, Takase B, Matsui T, Kikuchi M, Maehara T. *Vascularization in vivo caused by the controlled release of fibroblast growth factor-2 from an injectable chitosan/non-anticoagulant heparin hydrogel*. Biomaterials. 2004 Feb; 25(4): 699-706.

Fujita M, Ishihara M, Shimizu M, Obara K, Nakamura S, Kanatani Y, Morimoto Y, Takase B, Matsui T, Kikuchi M, Maehara T. *Therapeutic angiogenesis induced by controlled release of fibroblast growth factor-2 from injectable chitosan/non-anticoagulant heparin hydrogel in a rat hindlimb ischemia model*. Wound Repair Regen. 2007 Jan-Feb; 15(1): 58-65.

Galiano RD, Michaels J 5th, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. *Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing*. Wound Repair Regen. 2004a Jul-Aug; 12(4): 485-92.

Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, Steinmetz HG, Gurtner GC. *Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells*. Am J Pathol. 2004b Jun; 164(6): 1935-47.

Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, Chen H, Goldstein LJ, Buerk DG, Nedeau A, Thom SR, Velazquez OC. *Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha*. J Clin Invest. 2007 May; 117(5): 1249-59.

Gallant-Behm CL, Mustoe TA. *Occlusion regulates epidermal cytokine production and inhibits scar formation*. Wound Repair Regen. 2010 Mar-Apr; 18(2): 235-44.

Gallucci RM, Simeonova PP, Matheson JM, Kommineni C, Gurriel JL, Sugawara T, Luster MI. *Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice*. FASEB J. 2000 Dec; 14(15): 2525-31.

García-Esteo F, Pascual G, García-Honduvilla N, Gallardo A, San Román J, Bellón JM, Buján J. *Histological evaluation of scar tissue inflammatory response: the role of hGH in diabetic rats*. Histol Histopathol. 2005 Jan; 20(1): 53-7.

García-Esteo F, Pascual G, Gallardo A, San-Román J, Buján J, Bellón JM. *A biodegradable copolymer for the slow release of growth hormone expedites scarring in diabetic rats*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007 May; 81(2): 291-304.

García-Honduvilla N, Cifuentes A, Bellón JM, Buján J, Martínez A. *The angiogenesis promoter, proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), improves healing in both normoxic and ischemic wounds either alone or in combination with autologous stem/progenitor cells*. Histol Histopathol. 2013 Jan; 28(1): 115-25.

Gerotziafas GT, Petropoulou AD, Verdy E, Samama MM, Elalamy I. *Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation*. J Thromb Haemost. 2007 May; 5(5): 955-62.

Gill SE, Parks WC. *Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing*. Int J Biochem Cell Biol. 2008; 40(6-7): 1334-47.

Gimeno MJ, García-Esteo F, García-Honduvilla N, San Román J, Bellón JM, Buján J. *A novel controlled drug-delivery system for growth hormone applied to healing skin wounds in diabetic rats*. J Biomater Sci Polym Ed. 2003; 14(8): 821-35.

Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. *Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury*. Circulation. 2006 Aug 8; 114(6): 597-605.

Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Nowygrod S, Wolf BM, Caliste X, Yan SF, Stern DM, Schmidt AM. *Blockade of receptor for advanced glycation end-*

*products restores effective wound healing in diabetic mice.* Am J Pathol. 2001 Aug; 159(2): 513-25.

Gordon S. *Alternative activation of macrophages.* Nat Rev Immunol. 2003 Jan; 3(1): 23-35.

Goren I, Müller E, Schiefelbein D, Christen U, Pfeilschifter J, Mühl H, Frank S. *Systemic anti-TNF $\alpha$  treatment restores diabetes-impaired skin repair in ob/ob mice by inactivation of macrophages.* J Invest Dermatol. 2007 Sep; 127(9): 2259-67.

Gray E, Mulloy B. *Biosimilar low molecular weight heparin products.* J Thromb Haemost. 2009 Jul; 7(7): 1218-21.

Greenhalgh DG. *The role of apoptosis in wound healing.* Int J Biochem Cell Biol. 1998 Sep; 30(9): 1019-30.

Greenhalgh DG. *Wound healing and diabetes mellitus.* Clin Plast Surg. 2003 Jan; 30(1): 37-45.

Greives MR, Samra F, Pavlides SC, Blechman KM, Naylor SM, Woodrell CD, Cadacio C, Levine JP, Bancroft TA, Michalak M, Warren SM, Gold LI. *Exogenous calreticulin improves diabetic wound healing.* Wound Repair Regen. 2012 Sep-Oct; 20(5): 715-30.

Gunerhan Y, Koksall N, Gul O, Uzun MA, Guneş P, Adaleti R. *Effects of unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin on colonic anastomoses in the presence of experimental peritonitis.* Eur Surg Res. 2006; 38(3): 353-7.

Günter CI, Machens HG. *New strategies in clinical care of skin wound healing.* Eur Surg Res. 2012; 49(1): 16-23.

Guo S, Dipietro LA. *Factors affecting wound healing.* J Dent Res. 2010 Mar; 89(3): 219-29.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. *Wound repair and regeneration.* Nature. 2008 May 15; 453(7193): 314-21.

Haertel E, Werner S, Schäfer M. *Transcriptional regulation of wound inflammation.* Semin Immunol. 2014 Aug; 26(4): 321-8.



Häggström M. *Medical gallery of Mikael Häggström 2014*. Wikiversity Journal of Medicine 2014; 1 (2).

Han SK, Kim HR, Kim WK. *The treatment of diabetic foot ulcers with uncultured, processed lipoaspirate cells: a pilot study*. Wound Repair Regen. 2010 Jul-Aug; 18(4): 342-8.

Hehenberger K, Kratz G, Hansson A, Brismar K. *Fibroblasts derived from human chronic diabetic wounds have a decreased proliferation rate, which is recovered by the addition of heparin*. J Dermatol Sci. 1998 Jan; 16(2): 144-51.

Hench LL, Polak JM. *Third-generation biomedical materials*. Science. 2002 Feb 8; 295(5557): 1014-7.

Henshaw FR, Boughton P, Lo L, McLennan SV, Twigg SM. *Topically applied connective tissue growth factor/CCN2 improves diabetic preclinical cutaneous wound healing: potential role for CTGF in human diabetic foot ulcer healing*. J Diabetes Res. 2015; 2015: 236238.

Hex N, Bartlett C, Wright D, Taylor M, Varley D. *Estimating the current and future costs of Type 1 and Type 2 diabetes in the UK, including direct health costs and indirect societal and productivity costs*. Diabet Med. 2012 Jul; 29(7): 855-62.

Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. *Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation*. Am J Pathol. 2001 Sep; 159(3): 1009-20.

Hinz B. *Formation and function of the myofibroblast during tissue repair*. J Invest Dermatol. 2007 Mar; 127(3): 526-37.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. *The myofibroblast: one function, multiple origins*. Am J Pathol. 2007 Jun; 170(6): 1807-16.

Hinz B. *The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell*. J Biomech. 2010 Jan 5; 43(1): 146-55.

Hirsh J, Raschke R. *Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy*. Chest. 2004 Sep; 126(3 Suppl): 188S-203S.

Hirsh J, O'Donnell M, Eikelboom JW. *Beyond unfractionated heparin and warfarin: current and future advances*. Circulation. 2007 Jul 31; 116(5): 552-60.

Hochart H, Jenkins PV, Preston RJ, Smith OP, White B, O'Donnell J. *Concentration-dependent roles for heparin in modifying lipopolysaccharide-induced activation of mononuclear cells in whole blood*. Thromb Haemost. 2008 Mar; 99(3): 570-5.

Hocking AM. *Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cutaneous Wounds*. Adv Wound Care (New Rochelle). 2012 Aug; 1(4): 166-171.

Hoffmann DC, Textoris C, Oehme F, Klaassen T, Goppelt A, Römer A, Fugmann B, Davidson JM, Werner S, Krieg T, Eming SA. *Pivotal role for alpha1-antichymotrypsin in skin repair*. J Biol Chem. 2011 Aug 19; 286(33): 28889-901.

Holzapfel BM, Reichert JC, Schantz JT, Gbureck U, Rackwitz L, Nöth U, Jakob F, Rudert M, Groll J, Hutmacher DW. *How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view*. Adv Drug Deliv Rev. 2013 Apr; 65(4): 581-603.

Hu MS, Rennert RC, McArdle A, Chung MT, Walmsley GG, Longaker MT, Lorenz HP. *The role of stem cells during scarless skin wound healing*. Adv Wound Care (New Rochelle). 2014 Apr 1; 3(4): 304-314.

Huang Z, Lu M, Zhu G, Gao H, Xie L, Zhang X, Ye C, Wang Y, Sun C, Li X. *Acceleration of diabetic-wound healing with PEGylated rhaFGF in healing-impaired streptozocin diabetic rats*. Wound Repair Regen. 2011 Sep-Oct; 19(5): 633-44.

Iba Y, Shibata A, Kato M, Masukawa T. *Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice*. Int Immunopharmacol. 2004 Dec 20; 4(14): 1873-80.

Ishida Y, Kondo T, Takayasu T, Iwakura Y, Mukaida N. *The essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TGF-beta in the skin wound-healing process*. J Immunol. 2004 Feb 1; 172(3): 1848-55.

Ishihara M, Nakanishi K, Ono K, Sato M, Kikuchi M, Saito Y, Yura H, Matsui T, Hattori H, Uenoyama M, Kurita A. *Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process*. Biomaterials. 2002 Feb; 23(3): 833-40.

Javot L, Lecompte T, Rabiskova M, Maincent P. *Encapsulation of low molecular weight heparins: influence on the anti-Xa/anti-IIa ratio*. J Control Release. 2009 Oct 1; 139(1): 8-14.

Javot L, Sapin A, Scala-Bertola J, Vigneron C, Lecompte T, Maincent P. *Oral administration of a microencapsulated low-molecular-weight heparin to rabbits: anti-Xa and anti-IIa profiles*. Thromb Haemost. 2010 Jun; 103(6): 1254-67.

Jazwa A, Kucharzewska P, Leja J, Zagorska A, Sierpniowska A, Stepniewski J, Kozakowska M, Taha H, Ochiya T, Derlacz R, Vahakangas E, Yla-Herttuala S, Jozkowicz A, Dulak J. *Combined vascular endothelial growth factor-A and fibroblast growth factor 4 gene transfer improves wound healing in diabetic mice*. Genet Vaccines Ther. 2010 Aug 30; 8: 6.

Jeffcoate WJ, Harding KG. *Diabetic foot ulcers*. Lancet. 2003 May 3; 361(9368): 1545-51.

Jeffcoate WJ, Price P, Harding KG; International Working Group on Wound Healing and Treatments for People with Diabetic Foot Ulcers. *Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers*. Diabetes Metab Res Rev. 2004 May-Jun; 20 Suppl 1: S78-89.

Jeffcoate WJ, Lipsky BA, Berendt AR, Cavanagh PR, Bus SA, Peters EJ, van Houtum WH, Valk GD, Bakker K; *International Working Group on the Diabetic Foot*. *Unresolved issues in the management of ulcers of the foot in diabetes*. Diabet Med. 2008 Dec; 25(12): 1380-9.

Judith R, Nithya M, Rose C, Mandal AB. *Application of a PDGF-containing novel gel for cutaneous wound healing*. Life Sci. 2010 Jul 3; 87(1-2): 1-8.

Jung M, Lord MS, Cheng B, Lyons JG, Alkhouri H, Hughes JM, McCarthy SJ, Iozzo RV, Whitelock JM. *Mast cells produce novel shorter forms of perlecan that contain*

*functional endorepellin: a role in angiogenesis and wound healing.* J Biol Chem. 2013 Feb 1; 288(5): 3289-304.

Junker JP, Kamel RA, Caterson EJ, Eriksson E. *Clinical impact upon wound healing and inflammation in moist, wet, and dry environments.* Adv Wound Care (New Rochelle). 2013 Sep; 2(7): 348-356.

Kalani M, Apelqvist J, Blombäck M, Brismar K, Eliasson B, Eriksson JW, Fagrell B, Hamsten A, Torffvit O, Jörneskog G. *Effect of dalteparin on healing of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study.* Diabetes Care. 2003 Sep; 26(9): 2575-80.

Kamel RA, Ong JF, Eriksson E, Junker JP, Caterson EJ. *Tissue engineering of skin.* J Am Coll Surg. 2013 Sep; 217(3): 533-55.

Kamiński K, Szczubiałka K, Zazakowny K, Lach R, Nowakowska M. *Chitosan derivatives as novel potential heparin reversal agents.* J Med Chem. 2010 May 27; 53(10): 4141-7.

Kämpfer H, Paulukat J, Mühl H, Wetzler C, Pfeilschifter J, Frank S. *Lack of interferon-gamma production despite the presence of interleukin-18 during cutaneous wound healing.* Mol Med. 2000 Dec; 6(12): 1016-27.

Kenneth Ward W. *A review of the foreign-body response to subcutaneously-implanted devices: the role of macrophages and cytokines in biofouling and fibrosis.* J Diabetes Sci Technol. 2008 Sep; 2(5): 768-77.

Khanna S, Biswas S, Shang Y, Collard E, Azad A, Kauh C, Bhasker V, Gordillo GM, Sen CK, Roy S. *Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice.* PLoS One. 2010 Mar 4; 5(3): e9539.

Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histología y Biología Celular. Introducción a la anatomía patológica.* 3ª ed. Barcelona: Elsevier España; 2012. p. 339-363.

Kim HS, Yoo HS. *Matrix metalloproteinase-inspired suicidal treatments of diabetic ulcers with siRNA-decorated nanofibrous meshes.* Gene Ther. 2013 Apr; 20(4): 378-85.

King A, Balaji S, Le LD, Crombleholme TM, Keswani SG. *Regenerative wound healing: the role of interleukin-10*. Adv Wound Care (New Rochelle). 2014 Apr 1; 3(4): 315-323.

Kiyozumi T, Kanatani Y, Ishihara M, Saitoh D, Shimizu J, Yura H, Suzuki S, Okada Y, Kikuchi M. *The effect of chitosan hydrogel containing DMEM/F12 medium on full-thickness skin defects after deep dermal burn*. Burns. 2007 Aug; 33(5): 642-8.

Klingberg F, Hinz B, White ES. *The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis*. J Pathol. 2013 Jan; 229(2): 298-309.

Koh TJ, DiPietro LA. *Inflammation and wound healing: the role of the macrophage*. Expert Rev Mol Med. 2011 Jul 11; 13: e23.

Komesu MC, Tanga MB, Buttros KR, Nakao C. *Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing*. Pathophysiology. 2004 Oct; 11(2): 63-67.

Kranke P, Bennett MH, Martyn-St James M, Schnabel A, Debus SE. *Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds*. Cochrane Database Syst Rev. 2012 Apr 18; 4: CD004123.

Kratz G, Back M, Arnander C, Larm O. *Immobilised heparin accelerates the healing of human wounds in vivo*. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg. 1998 Dec; 32(4): 381-5.

Kus E, Bienkiewicz A. *Subcutaneous low molecular weight heparin administration promotes wound healing in rats*. Pathophysiology. 2006 May; 13(2): 81-4.

Kweon DK, Song SB, Park YY. *Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator*. Biomaterials. 2003 Apr; 24(9): 1595-601.

Kwon AH, Qiu Z, Hashimoto M, Yamamoto K, Kimura T. *Effects of medicinal mushroom (Sparassis crispa) on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats*. Am J Surg. 2009 Apr; 197(4): 503-9.

Laato M, Heino J, Gerdin B, Kähäri VM, Niinikoski J. *Interferon-gamma-induced inhibition of wound healing in vivo and in vitro*. Ann Chir Gynaecol Suppl. 2001; (215): 19-23.

Lakshmi TS, Shanmugasundaram N, Shanmuganathan S, Babu M. *Efficacy of desulfated heparin mitigating inflammation in rat burn wound model*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2011 May; 97(2): 215-23.

Lauer G, Sollberg S, Cole M, Flamme I, Stürzebecher J, Mann K, Krieg T, Eming SA. *Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds*. J Invest Dermatol. 2000 Jul; 115(1): 12-8.

Lauer G, Sollberg S, Cole M, Krieg T, Eming SA. *Generation of a novel proteolysis resistant vascular endothelial growth factor165 variant by a site-directed mutation at the plasmin sensitive cleavage site*. FEBS Lett. 2002 Nov 6; 531(2): 309-13.

Le H, Kleinerman R, Lerman OZ, Brown D, Galiano R, Gurtner GC, Warren SM, Levine JP, Saadeh PB. *Hedgehog signaling is essential for normal wound healing*. Wound Repair Regen. 2008 Nov-Dec; 16(6): 768-73.

Lee JH, Lee H, Joung YK, Jung KH, Choi JH, Lee DH, Park KD, Hong SS. *The use of low molecular weight heparin-pluronic nanogels to impede liver fibrosis by inhibition the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway*. Biomaterials. 2011 Feb; 32(5): 1438-45.

Lee S, Jung I, Yu S, Hong JP. *Effect of recombinant human epidermal growth factor impregnated chitosan film on hemostasis and healing of blood vessels*. Arch Plast Surg. 2014 Sep; 41(5): 466-71.

Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, Levine JP, Gurtner GC. *Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia*. Am J Pathol. 2003 Jan; 162(1): 303-12.

Li J, Chen J, Kirsner R. *Pathophysiology of acute wound healing*. Clin Dermatol. 2007 Jan-Feb; 25(1): 9-18.

Li JP, Vlodavsky I. *Heparin, heparan sulfate and heparanase in inflammatory reactions*. Thromb Haemost. 2009 Nov; 102(5): 823-8.

Li Y, Shin VY, Cheuk CY, Liu ES, Cho CH. *A 3.0-kDa low molecular weight heparin promotes gastric ulcer healing in rats*. Aliment Pharmacol Ther. 2001 Dec; 15(12): 2009-17.



Liang Y, Kiick KL. *Heparin-functionalized polymeric biomaterials in tissue engineering and drug delivery applications*. Acta Biomater. 2014 Apr; 10(4): 1588-600.

Liao H, Zakhaleva J, Chen W. *Cells and tissue interactions with glycated collagen and their relevance to delayed diabetic wound healing*. Biomaterials. 2009 Mar; 30(9): 1689-96.

Lin C, Mao C, Zhang J, Li Y, Chen X. *Healing effect of bioactive glass ointment on full-thickness skin wounds*. Biomed Mater. 2012 Aug; 7(4): 045017.

Lin H, Zhao Y, Sun W, Chen B, Zhang J, Zhao W, Xiao Z, Dai J. *The effect of crosslinking heparin to demineralized bone matrix on mechanical strength and specific binding to human bone morphogenetic protein-2*. Biomaterials. 2008 Mar; 29(9): 1189-97.

Lindblad WJ. *How should one study wound healing?* Wound Repair Regen. 2006 Sep-Oct; 14(5): 515.

Liu Y, Cai S, Shu XZ, Shelby J, Prestwich GD. *Release of basic fibroblast growth factor from a crosslinked glycosaminoglycan hydrogel promotes wound healing*. Wound Repair Regen. 2007 Mar-Apr; 15(2): 245-51.

Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweck S, Lehnert H. *Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients*. Diabetologia. 2002 Jul; 45(7): 1011-6.

Lobmann R, Schultz G, Lehnert H. *Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications*. Diabetes Care. 2005 Feb; 28(2): 461-71.

Lobmann R, Zemlin C, Motzkau M, Reschke K, Lehnert H. *Expression of matrix metalloproteinases and growth factors in diabetic foot wounds treated with a protease absorbent dressing*. J Diabetes Complications. 2006 Sep-Oct; 20(5): 329-35.

Löndahl M, Katzman P, Nilsson A, Hammarlund C. *Hyperbaric oxygen therapy facilitates healing of chronic foot ulcers in patients with diabetes*. Diabetes Care. 2010 May; 33(5): 998-1003.

Loots MA, Lamme EN, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E. *Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (non-insulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation*. Arch Dermatol Res. 1999 Feb-Mar; 291(2-3): 93-9.

Loughlin DT, Artlett CM. *3-Deoxyglucosone-collagen alters human dermal fibroblast migration and adhesion: implications for impaired wound healing in patients with diabetes*. Wound Repair Regen. 2009 Sep-Oct; 17(5): 739-49.

Loughlin DT, Artlett CM. *Precursor of advanced glycation end products mediates ER-stress-induced caspase-3 activation of human dermal fibroblasts through NAD(P)H oxidase 4*. PLoS One. 2010 Jun 14; 5(6): e11093.

Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W, Roers A, Eming SA. *Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair*. J Immunol. 2010 Apr 1; 184(7): 3964-77.

Luo JD, Hu TP, Wang L, Chen MS, Liu SM, Chen AF. *Sonic hedgehog improves delayed wound healing via enhancing cutaneous nitric oxide function in diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 Aug; 297(2): E525-31.

Ma L, Qiao H, He C, Yang Q, Cheung CH, Kanwar JR, Sun X. *Modulating the interaction of CXCR4 and CXCL12 by low-molecular-weight heparin inhibits hepatic metastasis of colon cancer*. Invest New Drugs. 2012 Apr; 30(2): 508-17.

Mace KA, Yu DH, Paydar KZ, Boudreau N, Young DM. *Sustained expression of Hif-1alpha in the diabetic environment promotes angiogenesis and cutaneous wound repair*. Wound Repair Regen. 2007 Sep-Oct; 15(5): 636-45.

Madlener M, Parks WC, Werner S. *Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair*. Exp Cell Res. 1998 Jul 10; 242(1): 201-10.

Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. *Macrophages in skin injury and repair*. Immunobiology. 2011 Jul; 216(7): 753-62.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol. 2004 Dec; 25(12): 677-86.

Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. J Pathol. 2013 Jan; 229(2): 176-85.

Margolis DJ, Bartus C, Hoffstad O, Malay S, Berlin JA. *Effectiveness of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers*. Wound Repair Regen. 2005 Nov-Dec; 13(6): 531-6.

Martin P. *Wound healing--aiming for perfect skin regeneration*. Science. 1997 Apr 4; 276(5309): 75-81.

Martin P, D'Souza D, Martin J, Grose R, Cooper L, Maki R, McKercher SR. *Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells*. Curr Biol. 2003 Jul 1; 13(13): 1122-8.

Martin P, Leibovich SJ. *Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly*. Trends Cell Biol. 2005 Nov; 15(11): 599-607.

Martínez-González J, Rodríguez C. *New challenges for a second-generation low-molecular-weight heparin: focus on bemiparin*. Expert Rev Cardiovasc Ther. 2010 May; 8(5): 625-34.

Martins-Green M. *The yin and yang of integrin function in re-epithelialization during wound healing*. Adv Wound Care (New Rochelle). 2013 Apr; 2(3): 75-80.

Martins-Green M, Petreaca M, Wang L. *Chemokines and Their Receptors Are Key Players in the Orchestra That Regulates Wound Healing*. Adv Wound Care (New Rochelle). 2013 Sep; 2(7): 327-347.

Maruyama K, Asai J, Ii M, Thorne T, Losordo DW, D'Amore PA. *Decreased macrophage number and activation lead to reduced lymphatic vessel formation and contribute to impaired diabetic wound healing*. Am J Pathol. 2007 Apr; 170(4): 1178-91.

Mayol L, De Stefano D, Campani V, De Falco F, Ferrari E, Cencetti C, Matricardi P, Maiuri L, Carnuccio R, Gallo A, Maiuri MC, De Rosa G. *Design and characterization of a chitosan physical gel promoting wound healing in mice*. J Mater Sci Mater Med. 2014 Jun; 25(6): 1483-93.

Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. *Impaired wound healing*. Clin Dermatol. 2007 Jan-Feb; 25(1): 19-25.

Menke MN, Menke NB, Boardman CH, Diegelmann RF. *Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing*. Gynecol Oncol. 2008 Nov; 111(2 Suppl): S87-91.

Merli GJ, Groce JB. *Pharmacological and clinical differences between low-molecular-weight heparins: implications for prescribing practice and therapeutic interchange*. P T. 2010 Feb; 35(2): 95-105.

Metcalf AD, Ferguson MW. *Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair*. Biomaterials. 2007a Dec; 28(34): 5100-13.

Metcalf AD, Ferguson MW. *Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration*. J R Soc Interface. 2007b Jun 22; 4(14): 413-37.

Mi Q, Rivière B, Clermont G, Steed DL, Vodovotz Y. *Agent-based model of inflammation and wound healing: insights into diabetic foot ulcer pathology and the role of transforming growth factor-beta1*. Wound Repair Regen. 2007 Sep-Oct; 15(5): 671-82.

Miao M, Niu Y, Xie T, Yuan B, Qing C, Lu S. *Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: a possible pathophysiologic correlation*. Wound Repair Regen. 2012 Mar-Apr; 20(2) : 203-13.

Michaels J 5th, Churgin SS, Blechman KM, Greives MR, Aarabi S, Galiano RD, Gurtner GC. *db/db mice exhibit severe wound-healing impairments compared with other murine diabetic strains in a silicone-splinted excisional wound model*. Wound Repair Regen. 2007 Sep-Oct; 15(5): 665-70.

Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. *Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix*. Int J Biochem Cell Biol. 2004 Jun; 36(6): 1031-7.

Miles RH, Paxton TP, Zacheis D, Dries DJ, Gamelli RL. *Systemic administration of interferon-gamma impairs wound healing*. J Surg Res. 1994 Mar; 56(3): 288-94.

Minagawa T, Okamura Y, Shigemasa Y, Minami S, Okamoto Y. *Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing*. Carbohydr Polym. 2007; 67(4): 640-644.

Miras-Parra F, Navascués-Martínez E, Gómez-Outes A, Martínez-González J, Rocha E; Bemiparin Cooperative Study Group in Medical Patients. *Utilisation and safety of bemiparin, a low-molecular-weight heparin, in medical patients : a prospective, uncontrolled cohort study*. Clin Drug Investig. 2005; 25(7): 463-72.

Mirza R DiPietro LA, Koh TJ. *Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice*. Am J Pathol. 2009 Dec; 175(6): 2454-62.

Mirza R, Koh TJ. *Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice*. Cytokine. 2011 Nov; 56(2): 256-64.

Mohandas A, Anisha BS, Chennazhi KP, Jayakumar R. *Chitosan-hyaluronic acid/VEGF loaded fibrin nanoparticles composite sponges for enhancing angiogenesis in wounds*. Colloids Surf B Biointerfaces. 2015 Mar 1; 127: 105-13.

Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, Befus AD. *Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function*. Mucosal Immunol. 2010 Mar; 3(2): 111-28.

Morasso MI, Tomic-Canic M. *Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing*. Biol Cell. 2005 Mar; 97(3): 173-83.

Mori Y, Nakamura S, Kishimoto S, Kawakami M, Suzuki S, Matsui T, Ishihara M. *Preparation and characterization of low-molecular-weight heparin/protamine nanoparticles (LMW-H/P NPs) as FGF-2 carrier*. Int J Nanomedicine. 2010 Apr 7; 5: 147-55.

Mousa SA. *Heparin and low-molecular weight heparins in thrombosis and beyond*. Methods Mol Biol. 2010; 663: 109-32.

Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Kloeters O. *Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis*. Plast Reconstr Surg. 2006 Jun; 117(7 Suppl): 35S-41S.

Nascimento EG, Sampaio TB, Medeiros AC, Azevedo EP. *Evaluation of chitosan gel with 1% silver sulfadiazine as an alternative for burn wound treatment in rats*. Acta Cir Bras. 2009 Nov-Dec; 24(6): 460-5.

Ng MF. *The role of mast cells in wound healing*. Int Wound J. 2010 Feb; 7(1): 55-61.

Nguyen PD, Tutela JP, Thanik VD, Knobel D, Allen RJ Jr, Chang CC, Levine JP, Warren SM, Saadeh PB. *Improved diabetic wound healing through topical silencing of p53 is associated with augmented vasculogenic mediators*. Wound Repair Regen. 2010 Nov-Dec; 18(6): 553-9.

Nie T, Akins RE Jr, Kiick KL. *Production of heparin-containing hydrogels for modulating cell responses*. Acta Biomater. 2009 Mar; 5(3): 865-75.

Nishikori Y, Shiota N, Okunishi H. *The role of mast cells in cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice*. Arch Dermatol Res. 2014 Nov; 306(9): 823-35.

Nissen NN, Shankar R, Gamelli RL, Singh A, DiPietro LA. *Heparin and heparan sulphate protect basic fibroblast growth factor from non-enzymic glycosylation*. Biochem J. 1999 Mar 15; 338 ( Pt 3): 637-42.

Niu Y, Xie T, Ge K, Lin Y, Lu S. *Effects of extracellular matrix glycosylation on proliferation and apoptosis of human dermal fibroblasts via the receptor for advanced glycosylated end products*. Am J Dermatopathol. 2008 Aug; 30(4): 344-51.

Noli C, Miolo A. *The mast cell in wound healing*. Vet Dermatol. 2001 Dec; 12(6): 303-13.

Norrby K. *Low-molecular-weight heparins and angiogenesis*. APMIS. 2006 Feb; 114(2): 79-102.



Norrby K, Nordenhem A. *Dalteparin, a low-molecular-weight heparin, promotes angiogenesis mediated by heparin-binding VEGF-A in vivo*. APMIS. 2010 Dec; 118(12): 949-57.

Nowak G. *Heparin-induced thrombocytopenia (HIT II) - a drug-associated autoimmune disease*. Thromb Haemost. 2009 Nov; 102(5): 887-91.

Nwomeh BC, Liang HX, Cohen IK, Yager DR. *MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers*. J Surg Res. 1999 Feb; 81(2): 189-95.

Obara K, Ishihara M, Fujita M, Kanatani Y, Hattori H, Matsui T, Takase B, Ozeki Y, Nakamura S, Ishizuka T, Tominaga S, Hiroi S, Kawai T, Maehara T. *Acceleration of wound healing in healing-impaired db/db mice with a photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2*. Wound Repair Regen. 2005 Jul-Aug; 13(4): 390-7.

Occleston NL, O'Kane S, Lavery HG, Cooper M, Fairlamb D, Mason T, Bush JA, Ferguson MW. *Discovery and development of avotermin (recombinant human transforming growth factor beta 3): a new class of prophylactic therapeutic for the improvement of scarring*. Wound Repair Regen. 2011 Sep; 19 Suppl 1: s38-48.

Ogawa R. *Mechanobiology of scarring*. Wound Repair Regen. 2011 Sep; 19 Suppl 1: s2-9.

Okano Y, Masaki H, Sakurai H. *Dysfunction of dermal fibroblasts induced by advanced glycation end-products (AGEs) and the contribution of a nonspecific interaction with cell membrane and AGEs*. J Dermatol Sci. 2002 Sep; 29(3): 171-80.

Okizaki S, Ito Y, Hosono K, Oba K, Ohkubo H, Amano H, Shichiri M, Majima M. *Suppressed recruitment of alternatively activated macrophages reduces TGF- $\beta$ 1 and impairs wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice*. Biomed Pharmacother. 2015 Mar; 70: 317-25.

Oliveira MI, Santos SG, Oliveira MJ, Torres AL, Barbosa MA. *Chitosan drives anti-inflammatory macrophage polarisation and pro-inflammatory dendritic cell stimulation*. Eur Cell Mater. 2012 Jul 24; 24: 136-52.

Oliveira SS, Oliveira FS, Gaitani CM, Marchetti JM. *Microparticles as a strategy for low-molecular-weight heparin delivery*. J Pharm Sci. 2011 May; 100(5): 1783-92.

Ono I, Yamashita T, Hida T, Jin HY, Ito Y, Hamada H, Akasaka Y, Ishii T, Jimbow K. *Local administration of hepatocyte growth factor gene enhances the regeneration of dermis in acute incisional wounds*. J Surg Res. 2004a Jul; 120(1): 47-55.

Ono I, Yamashita T, Hida T, Jin HY, Ito Y, Hamada H, Akasaka Y, Ishii T, Jimbow K. *Combined administration of basic fibroblast growth factor protein and the hepatocyte growth factor gene enhances the regeneration of dermis in acute incisional wounds*. Wound Repair Regen. 2004b Jan-Feb; 12(1): 67-79.

Opalenik SR, Davidson JM. *Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair*. FASEB J. 2005 Sep; 19(11): 1561-3.

Oskeritzian CA. *Mast Cells and Wound Healing*. Adv Wound Care (New Rochelle). 2012 Feb; 1(1): 23-28.

Pakyari M, Farrokhi A, Maharlooei MK, Ghahary A. *Critical role of transforming growth factor beta in different phases of wound healing*. Adv Wound Care (New Rochelle). 2013 Jun; 2(5): 215-224.

Paliwal R, Paliwal SR, Agrawal GP, Vyas SP. *Chitosan nanoconstructs for improved oral delivery of low molecular weight heparin: In vitro and in vivo evaluation*. Int J Pharm. 2012 Jan 17; 422(1-2): 179-84.

Panchatcharam M, Miriyala S, Gayathri VS, Suguna L. *Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species*. Mol Cell Biochem. 2006 Oct; 290(1-2): 87-96.

Park HJ, Lee J, Kim MJ, Kang TJ, Jeong Y, Um SH, Cho SW. *Sonic hedgehog intradermal gene therapy using a biodegradable poly( $\beta$ -amino esters) nanoparticle to enhance wound healing*. Biomaterials. 2012 Dec; 33(35): 9148-56.

Park JE, Barbul A. *Understanding the role of immune regulation in wound healing*. Am J Surg. 2004 May; 187(5A): 11S-16S.

Park SA, Teixeira LB, Raghunathan VK, Covert J, Dubielzig RR, Isseroff RR, Schurr M, Abbott NL, McAnulty J, Murphy CJ. *Full-thickness splinted skin wound healing models in db/db and heterozygous mice: implications for wound healing impairment*. Wound Repair Regen. 2014 May-Jun; 22(3): 368-80.

Parks WC. *Matrix metalloproteinases in repair*. Wound Repair Regen. 1999 Nov-Dec; 7(6): 423-32.

Pastar I, Stojadinovic O, Krzyzanowska A, Barrientos S, Stuelten C, Zimmerman K, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M. *Attenuation of the transforming growth factor beta-signaling pathway in chronic venous ulcers*. Mol Med. 2010 Mar; 16(3-4): 92-101.

Peniche H, Reyes-Ortega F, Aguilar MR, Rodríguez G, Abradelo C, García-Fernández L, Peniche C, San Román J. *Thermosensitive macroporous cryogels functionalized with bioactive chitosan/bemiparin nanoparticles*. Macromol Biosci. 2013 Nov; 13(11): 1556-67.

Peplow PV. *Glycosaminoglycan: a candidate to stimulate the repair of chronic wounds*. Thromb Haemost. 2005 Jul; 94(1): 4-16.

Peppas M, Stavroulakis P, Raptis SA. *Advanced glycoxidation products and impaired diabetic wound healing*. Wound Repair Regen. 2009 Jul-Aug; 17(4): 461-72.

Puxeddu I, Piliponsky AM, Bachelet I, Levi-Schaffer F. *Mast cells in allergy and beyond*. Int J Biochem Cell Biol. 2003 Dec; 35(12): 1601-7.

Qiu Z, Kwon AH, Kamiyama Y. *Effects of plasma fibronectin on the healing of full-thickness skin wounds in streptozotocin-induced diabetic rats*. J Surg Res. 2007 Mar; 138(1): 64-70.

Radisky DC, Kenny PA, Bissell MJ. *Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT?* J Cell Biochem. 2007 Jul 1; 101(4): 830-9.

Rafehi H, El-Osta A, Karagiannis TC. *Genetic and epigenetic events in diabetic wound healing*. Int Wound J. 2011 Feb; 8(1): 12-21.

Reinke JM, Sorg H. *Wound repair and regeneration*. Eur Surg Res. 2012; 49(1): 35-43.

- Reyes-Ortega F, Cifuentes A, Rodríguez G, Aguilar MR, González-Gómez Á, Solis R, García-Honduvilla N, Buján J, García-Sanmartín J, Martínez A, Román JS. *Bioactive bilayered dressing for compromised epidermal tissue regeneration with sequential activity of complementary agents*. Acta Biomater. 2015 May 27 (pendiente de paginar).
- Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, Silva JC, Borges JP, Pires E, Chaves P, Correia IJ. *Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing*. Wound Repair Regen. 2009 Nov-Dec; 17(6): 817-24.
- Rodero MP, Legrand JM, Bou-Gharios G, Khosrotehrani K. *Wound-associated macrophages control collagen 1 $\alpha$ 2 transcription during the early stages of skin wound healing*. Exp Dermatol. 2013 Feb; 22(2): 143-5.
- Romana-Souza B, Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A. *Propranolol improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats*. Eur J Pharmacol. 2009 Jun 2; 611(1-3): 77-84.
- Ross MH, Pawlina W. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. 6ª ed. Buenos Aires: Panamericana; 2012. p. 105-197, 488-525.
- Roth D, Piekarek M, Paulsson M, Christ H, Bloch W, Krieg T, Davidson JM, Eming SA. *Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair*. Am J Pathol. 2006 Feb; 168(2): 670-84.
- Rullan M, Cerdà L, Frontera G, Masmiquel L, Llobera J. *Treatment of chronic diabetic foot ulcers with bemiparin: a randomized, triple-blind, placebo-controlled, clinical trial*. Diabet Med. 2008 Sep; 25(9): 1090-5. Fe de erratas en: Diabet Med. 2008 Oct; 25(10): 1257.
- Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen & Co, London; 1959.
- Ruszczak Z. *Effect of collagen matrices on dermal wound healing*. Adv Drug Deliv Rev. 2003 Nov 28; 55(12): 1595-611.
- Saap LJ, Falanga V. *Debridement performance index and its correlation with complete closure of diabetic foot ulcers*. Wound Repair Regen. 2002 Nov-Dec; 10(6): 354-9.

- Sakiyama-Elbert SE. *Incorporation of heparin into biomaterials*. Acta Biomater. 2014 Apr; 10(4): 1581-7.
- Salas A, Sans M, Soriano A, Reverter JC, Anderson DC, Piqué JM, Panés J. *Heparin attenuates TNF-alpha induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism*. Gut. 2000 Jul; 47(1): 88-96.
- Santoro MM, Gaudino G. *Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing*. Exp Cell Res. 2005 Mar 10; 304(1): 274-86.
- Sahrudi K, Kaiser G, Thomas A, Michel M, Wolf H, Mousavi M, Aharinejad S. *The influence of low molecular weight heparin on the expression of osteogenic growth factors in human fracture healing*. Int Orthop. 2012 May; 36(5): 1095-8.
- Sarrazy V, Billet F, Micallef L, Coulomb B, Desmoulière A. *Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments*. Wound Repair Regen. 2011 Sep; 19 Suppl 1: s10-5.
- Scales BS, Huffnagle GB. *The microbiome in wound repair and tissue fibrosis*. J Pathol. 2013 Jan; 229(2): 323-31.
- Schäfer M, Werner S. *Oxidative stress in normal and impaired wound repair*. Pharmacol Res. 2008a Aug; 58(2): 165-71.
- Schäfer M, Werner S. *Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008b Aug; 9(8): 628-38.
- Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. *STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells*. Diabetes. 1994 Nov; 43(11): 1326-33.
- Schönfelder U, Abel M, Wiegand C, Klemm D, Elsner P, Hipler UC. *Influence of selected wound dressings on PMN elastase in chronic wound fluid and their antioxidative potential in vitro*. Biomaterials. 2005 Nov; 26(33): 6664-73.
- Schultz GS, Davidson JM, Kirsner RS, Bornstein P, Herman IM. *Dynamic reciprocity in the wound microenvironment*. Wound Repair Regen. 2011 Mar-Apr; 19(2): 134-48.

Sen CK, Roy S. *Redox signals in wound healing*. Biochim Biophys Acta. 2008 Nov; 1780(11): 1348-61.

Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK, Gottrup F, Gurtner GC, Longaker MT. *Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy*. Wound Repair Regen. 2009 Nov-Dec; 17(6): 763-71.

Shen H, Yao P, Lee E, Greenhalgh D, Soulika AM. *Interferon-gamma inhibits healing post scald burn injury*. Wound Repair Regen. 2012 Jul-Aug; 20(4): 580-91.

Shirakata Y, Kimura R, Nanba D, Iwamoto R, Tokumaru S, Morimoto C, Yokota K, Nakamura M, Sayama K, Mekada E, Higashiyama S, Hashimoto K. *Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing*. J Cell Sci. 2005 Jun 1; 118(Pt 11): 2363-70.

Simpson DM, Ross R. *The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum*. J Clin Invest. 1972 Aug; 51(8): 2009-23.

Singer AJ, Clark RA. *Cutaneous wound healing*. N Engl J Med. 1999 Sep 2; 341(10): 738-46.

Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. *Advanced glycation end-products: a review*. Diabetologia. 2001 Feb; 44(2): 129-46. Fe de erratas en: Diabetologia 2002 Feb; 45(2): 293.

Siqueira MF, Li J, Chehab L, Desta T, Chino T, Krothpali N, Behl Y, Alikhani M, Yang J, Braasch C, Graves DT. *Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF-alpha dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1)*. Diabetologia. 2010 Feb; 53(2): 378-88.

Sivamani RK, Garcia MS, Isseroff RR. *Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing*. Front Biosci. 2007 May 1; 12: 2849-68.

Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. *Impediments to wound healing*. Am J Surg. 1998 Aug; 176 (2A Supl.): 39S-47S.

Steed DL. *Debridement*. Am J Surg. 2004 May; 187(5A): 71S-74S.



- Stout RD. *Editorial: macrophage functional phenotypes: no alternatives in dermal wound healing?* J Leukoc Biol. 2010 Jan; 87(1): 19-21.
- Sun B, Chen B, Zhao Y, Sun W, Chen K, Zhang J, Wei Z, Xiao Z, Dai J. *Crosslinking heparin to collagen scaffolds for the delivery of human platelet-derived growth factor.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009 Oct; 91(1): 366-72.
- Tam JC, Lau KM, Liu CL, To MH, Kwok HF, Lai KK, Lau CP, Ko CH, Leung PC, Fung KP, Lau CB. *The in vivo and in vitro diabetic wound healing effects of a 2-herb formula and its mechanisms of action.* J Ethnopharmacol. 2011 Apr 12; 134(3): 831-8.
- Tang J, Liu H, Gao C, Mu L, Yang S, Rong M, Zhang Z, Liu J, Ding Q, Lai R. *A small peptide with potential ability to promote wound healing.* PLoS One. 2014 Mar 19; 9(3): e92082.
- Téot L, Otman S, Trial C, Brancati A. *The use of noncellularized artificial dermis in the prevention of scar contracture and hypertrophy.* Wound Repair Regen. 2011 Sep; 19 Suppl 1: s49-58.
- Tesch GH, Allen TJ. *Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy.* Nephrology (Carlton). 2007 Jun; 12(3): 261-6.
- Toker S, Gulcan E, Cayc MK, Olgun EG, Erbilien E, Ozay Y. *Topical atorvastatin in the treatment of diabetic wounds.* Am J Med Sci. 2009 Sep; 338(3): 201-4.
- Tsang MW, Wong WK, Hung CS, Lai KM, Tang W, Cheung EY, Kam G, Leung L, Chan CW, Chu CM, Lam EK. *Human epidermal growth factor enhances healing of diabetic foot ulcers.* Diabetes Care. 2003 Jun; 26(6): 1856-61.
- Tuyet HL, Nguyen Quynh TT, Vo Hoang Minh H, Thi Bich DN, Do Dinh T, Le Tan D, Van HL, Le Huy T, Doan Huu H, Tran Trong TN. *The efficacy and safety of epidermal growth factor in treatment of diabetic foot ulcers: the preliminary results.* Int Wound J. 2009 Apr; 6(2): 159-66.
- Uchi H, Igarashi A, Urabe K, Koga T, Nakayama J, Kawamori R, Tamaki K, Hirakata H, Ohura T, Furue M. *Clinical efficacy of basic fibroblast growth factor (bFGF) for diabetic ulcer.* Eur J Dermatol. 2009 Sep-Oct; 19(5): 461-8.

Ueno H, Mori T, Fujinaga T. *Topical formulations and wound healing applications of chitosan*. Adv Drug Deliv Rev. 2001 Nov 5; 52(2): 105-15.

Vaalamo M, Leivo T, Saarialho-Kere U. *Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3, and -4) in normal and aberrant wound healing*. Hum Pathol. 1999 Jul; 30(7): 795-802.

Vallone PM, Butler JM. *AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures*. Biotechniques. 2004 Aug; 37(2): 226-31.

van der Veen VC, Boekema BK, Ulrich MM, Middelkoop E. *New dermal substitutes*. Wound Repair Regen. 2011 Sep; 19 Suppl 1: s59-65.

van Putten SM, Ploeger DT, Popa ER, Bank RA. *Macrophage phenotypes in the collagen-induced foreign body reaction in rats*. Acta Biomater. 2013 May; 9(5): 6502-10.

van Sluis GL, Nieuwdorp M, Kamphuisen PW, van der Vlag J, Van Noorden CJ, Spek CA. *A low molecular weight heparin inhibits experimental metastasis in mice independently of the endothelial glycocalyx*. PLoS One. 2010 Jun 21; 5(6): e11200.

Varin A, Gordon S. *Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology*. Immunobiology. 2009; 214(7): 630-41.

Velander P, Theopold C, Bleiziffer O, Bergmann J, Svensson H, Feng Y, Eriksson E. *Cell suspensions of autologous keratinocytes or autologous fibroblasts accelerate the healing of full thickness skin wounds in a diabetic porcine wound healing model*. J Surg Res. 2009 Nov; 157(1): 14-20.

Vermolen FJ, van Baaren E, Adam JA. *A simplified model for growth factor induced healing of wounds*. Mathematical and Computer Modelling 2006; 44: 887–898

Vignoli A, Marchetti M, Russo L, Cantalino E, Diani E, Bonacina G, Falanga A. *LMWH bemiparin and ULMWH RO-14 reduce the endothelial angiogenic features elicited by leukemia, lung cancer, or breast cancer cells*. Cancer Invest. 2011 Feb; 29(2): 153-61.

Volk SW, Radu A, Zhang L, Liechty KW. *Stromal progenitor cell therapy corrects the wound-healing defect in the ischemic rabbit ear model of chronic wound repair*. Wound Repair Regen. 2007 Sep-Oct; 15(5): 736-47.

Wang JM, Isenberg JS, Billiar TR, Chen AF. *Thrombospondin-1/CD36 pathway contributes to bone marrow-derived angiogenic cell dysfunction in type 1 diabetes via Sonic hedgehog pathway suppression*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2013 Dec; 305(12): E1464-72.

Wang XN, Chen CZ, Yang M, Gu YJ. *Implantation of decellularized small-caliber vascular xenografts with and without surface heparin treatment*. Artif Organs. 2007 Feb; 31(2): 99-104.

Wang Z, Gleichmann H. *GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice*. Diabetes. 1998 Jan; 47(1): 50-6.

Waugh HV, Sherratt JA. *Macrophage dynamics in diabetic wound dealing*. Bull Math Biol. 2006 Jan; 68(1): 197-207.

Weller CL, Collington SJ, Williams T, Lamb JR. *Mast cells in health and disease*. Clin Sci (Lond). 2011 Jun; 120(11): 473-84.

Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer M. *Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice*. FASEB J. 2006 Nov; 20(13): 2366-8.

Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT. *The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds*. Science. 1994 Nov 4; 266(5186): 819-22.

Werner S, Grose R. *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*. Physiol Rev. 2003 Jul; 83(3): 835-70.

Werner S, Krieg T, Smola H. *Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing*. J Invest Dermatol. 2007 May; 127(5): 998-1008.

Wetzler C, Kämpfer H, Stallmeyer B, Pfeilschifter J, Frank S. *Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair.* J Invest Dermatol. 2000 Aug; 115(2): 245-53.

Whelan D, Caplice NM, Clover AJ. *Fibrin as a delivery system in wound healing tissue engineering applications.* J Control Release. 2014 Dec 28; 196: 1-8.

Wicks K, Torbica T, Mace KA. *Myeloid cell dysfunction and the pathogenesis of the diabetic chronic wound.* Semin Immunol. 2014 Aug; 26(4): 341-53.

Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. *Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study.* Diabetes Care. 1998 May; 21(5): 822-7.

Wilgus TA. *Immune cells in the healing skin wound: influential players at each stage of repair.* Pharmacol Res. 2008 Aug; 58(2): 112-6.

Williamson D, Harding K. *Wound healing.* Medicine (UK). 2004; 32(12): 4-7.

Wu Y, Wang J, Scott PG, Tredget EE. *Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review.* Wound Repair Regen. 2007a Sep-Oct; 15 Suppl 1: S18-26.

Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. *Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis.* Stem Cells. 2007b Oct; 25(10): 2648-59.

Wulff BC, Parent AE, Meleski MA, DiPietro LA, Schrementi ME, Wilgus TA. *Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing.* J Invest Dermatol. 2012 Feb; 132(2): 458-65.

Wulff BC, Wilgus TA. *Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye?* Exp Dermatol. 2013 Aug; 22(8): 507-10.

Wynn TA. *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis.* J Pathol. 2008 Jan; 214(2): 199-210.

Xu F, Zhang C, Graves DT. *Abnormal cell responses and role of TNF- $\alpha$  in impaired diabetic wound healing*. Biomed Res Int. 2013; 2013: 754802.

Yan X, Chen B, Lin Y, Li Y, Xiao Z, Hou X, Tan Q, Dai J. *Acceleration of diabetic wound healing by collagen-binding vascular endothelial growth factor in diabetic rat model*. Diabetes Res Clin Pract. 2010 Oct; 90(1): 66-72.

Yang HS, Shin J, Bhang SH, Shin JY, Park J, Im GI, Kim CS, Kim BS. *Enhanced skin wound healing by a sustained release of growth factors contained in platelet-rich plasma*. Exp Mol Med. 2011 Nov 30; 43(11): 622-9.

Yao C, Roderfeld M, Rath T, Roeb E, Bernhagen J, Steffens G. *The impact of proteinase-induced matrix degradation on the release of VEGF from heparinized collagen matrices*. Biomaterials. 2006 Mar; 27(8): 1608-16.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC Bioinformatics. 2012 Jun 18; 13: 134.

Zhao G, Usui ML, Lippman SI, James GA, Stewart PS, Fleckman P, Olerud JE. *Biofilms and inflammation in chronic wounds*. Adv Wound Care (New Rochelle). 2013 Sep; 2(7): 389-399.

Zieris A, Prokoph S, Levental KR, Welzel PB, Grimmer M, Freudenberg U, Werner C. *FGF-2 and VEGF functionalization of starPEG-heparin hydrogels to modulate biomolecular and physical cues of angiogenesis*. Biomaterials. 2010 Nov; 31(31): 7985-94.

